

**KONTROLLUNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
KONSTANZ DER
X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE
IN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN**

Henning Datan

1976

AUS DER KINDERFOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. H. SPIESS

KONTROLLUNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KONSTANZ
DER X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE
IN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Henning Daton

aus
München

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. J.-D. Murken

Mitberichterstatter: Professor Dr. H. Spiess

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.1976

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Meinen Eltern

	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1.	<u>E I N L E I T U N G</u>	1
2.	<u>L I T E R A T U R Z U R X - C H R O M O - S O M A L E N H E T E R O Z Y K L I E</u>	2
2.1.	DNS-Synthesesyklus	2
2.2.	Chromosomenautoradiographie	3
2.3.	Chromosomenidentifizierung durch auto- radiographische Replikationsmuster	3
2.4.	X-chromosomale Heterozyklie	4
2.5.	X-chromosomale Heterochromasie	7
2.6.	X-chromosomale Inaktivität	8
2.7.	Heterozyklie als Zeichen genetischer Inaktivität	8
3.	<u>P R O B L E M S T E L L U N G</u>	9
4.	<u>M A T E R I A L U N D M E T H O D I K</u>	10
4.1.	Probanden	10
4.2.	Chromosomenpräparation	11
4.3.	Kriterien der Mitosenauswahl	11
4.4.	Einteilung der Zellen in 3 Stadien der S-Phase	11
4.5.	Durchführung der Untersuchungen	13
4.5.1.	Mitosenphotographie der autoradio- graphierten Metaphasen	13

	Seite
4.5.2. Entfernung des autoradiographischen Films	13
4.5.3. Nachfärbung mit saurem Orcein	14
4.5.4. Photographie der unmarkierten mit Orcein nachgefärbten Metaphaseplatten	14
5. <u>E R G E B N I S S E</u>	15
5.1. Häufigkeit der Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie	15
5.2. Analyse der Zellen mit heterozyklischem X-Chromosom	16
5.3. Analyse der Zellen ohne heterozyklisches X-Chromosom	21
5.4. Zuordnung der Zellen zu einem Stadium der späten S-Phase der DNS-Synthese	23
5.4.1 Aufschlüsselung aller Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie	23
5.4.1.1. Aufschlüsselung der Zellen mit X-chromo- somaler Heterozyklie für die drei Probanden	25
5.4.1.2. Aufschlüsselung der Zellen ohne X-chromo- somale Heterozyklie für die drei Probanden	27
5.4.2. Zellen mit falsch bestimmter X-chromo- somaler Heterozyklie	27
5.5. Nebenbefund: Auffallendes Markierungs- muster eines weiteren Chromosoms der C-Gruppe	28
5.5.1. Häufigkeit des "C"-Chromosoms bei den drei Probanden	30
5.5.2. Zuordnung des "C"-Chromosoms zu den 4 Stadien der späten S-Phase	32

6.	<u>D I S K U S S I O N</u>	35
6.1.	Allgemeine Fehlerquellen der Autoradiographie	35
6.2.	Kritische Stellungnahme zu den eigenen Ergebnissen	36
6.2.1.	Hohe Prozentzahlen fehlender X-chromosomaler Heterozyklie	36
6.2.1.1.	Vergleich mit Angaben in der Literatur	36
6.2.1.2.	Überprüfung der Auswahlkriterien	36
6.2.1.3.	Bewertung	37
6.2.2.	Auftreten von Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie in allen untersuchten Stadien der DNS-Synthese	38
6.2.2.1.	Kriterien für die Stadieneinteilung der späten S-Phase	38
6.2.2.2.	Bewertung	41
6.2.3.	Andere spät replizierende Chromosomen	45
6.2.3.1.	Identifizierung spät replizierender Chromosomen	45
6.2.3.2.	Ursachen von Fehlbestimmungen und Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie	45
6.2.3.3.	Konstanz spät replizierender Chromosomen	46
6.2.4.	Nebenbefund: Auffallendes Markierungsmuster eines weiteren Chromosoms der C-Gruppe	47
6.2.4.1.	Versuch der Identifizierung	47
6.2.4.2.	Bewertung	47
6.3.	Bedeutung der Befunde	48
6.3.1.	Zusammenhang zwischen Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie und X-Chromatin-negativen Zellen	48
6.3.2.	Zusammenhang mit anderen Befunden über eine variable X-chromosomale Heterozyklieausprägung (GUNDLACH 1974)	51

	Seite
6.3.3. Bedeutung für weitere Untersuchungen der X-chromosomalen Heterozyklie	51
6.3.4. Einschränkung	51
7. <u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	52
<u>L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S</u>	53

1. E I N L E I T U N G

Mit Hilfe autoradiographischer Techniken lassen sich zeitliche Unterschiede im DNS-Replikationsverhalten der Chromosomen feststellen. Bei weiblichen Individuen fällt besonders ein X-Chromosom durch einen verspäteten Replikationszeitpunkt auf. Dieses Phänomen wird als X-chromosomale Heterozyklie bezeichnet.

Die Ursache für die X-chromosomale Heterozyklie ist nicht bekannt. Nach einer Hypothese von LYON (1961, 1962, 1963) wird ein X-Chromosom der Frau zu einem frühembryonalen Zeitpunkt irreversibel inaktiviert. Es wird vielfach angenommen, daß die X-chromosomale Heterozyklie ein morphologischer Ausdruck dieser genetischen Inaktivität sei. Sollte diese Annahme richtig sein, so müßte auch die Heterozyklie irreversibel, d.h. in jeder weiblichen Zelle in gleicher Ausprägung vorhanden sein.

In der vorliegenden Arbeit soll an einer größeren Anzahl markierter Metaphaseplatten durch Entfernung der Silberkörner kontrolliert werden, ob die X-chromosomale Heterozyklie ein für jede weibliche Lymphozytenzelle konstantes Phänomen ist.

2. LITERATUR ZUR X-CHROMO- SOMALEN HETEROZYKLIE

2.1. DNS-Synthesezyklus

Die DNS der Chromosomen wird bei der Zellteilung nach der identischen Reduplikation von Zelle zu Zelle weitergegeben. Der zeitliche Ablauf des Zellwachstums und der Reduplikation findet in einem bestimmten Zellzyklus statt. (Fig. 1)

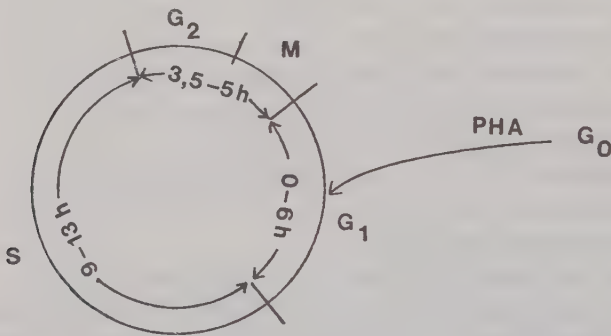


Fig. 1 Schematische Darstellung des Zellzyklus von Lymphozyten zusammengestellt aus SÖREN (1973)

Vor jeder Mitose und nach ihrem Ende bestehen zwei Intervalle, G₂- und G₁-Phase, in denen keine DNS synthetisiert wird. Die Synthese der DNS vollzieht sich nur in der Synthesephase, S-Phase. Bei einigen Zellsystemen besteht nach der Mitosephase eine Ruhephase G₀, aus der die Zellen nach Stimulierung in die G₁-Phase eintreten. Diese G₀-Phase wird auch für Lymphozyten angenommen, die durch Stimulierung mit Phytohämagglutinin (PHA) ihre G₁-Phase beginnen. (JOHN u. LEWIS 1969)

Die Dauer der G_1 -Phase kann im Gegensatz zu den anderen Phasen (S- und G_2 +M-Phase) in starkerem Maße variieren (SÖREN 1973).

2.2. Chromosomenautoradiographie

Wenn während der S-Phase Tritium markiertes Thymidin (^3H -Thymidin) zugeführt wird, so wird dieses wie normales Thymidin in die neugebildeten DNS-Stränge eingebaut. Überzieht man das Chromosomenpräparat mit einem photographischen Film, so haben die Betastrahlen des markierten Thymidins die gleiche Wirkung wie Lichtstrahlen, sie führen zu einer Reduktion der Silberteilchen. An den Stellen, an denen das ^3H -Thymidin in die DNS eingebaut worden ist, zeigt sich im darüberliegenden Film nach der Entwicklung eine Schwärzung, die in Form kleiner Körnchen über den Chromosomen sichtbar ist (PELC 1947; TAYLOR 1957).

2.3. Chromosomenidentifizierung durch autoradiographische Replikationsmuster

Durch Pulsmarkierungsversuche mit ^3H -Thymidin wurde beim Bakterienchromosom von *Escherichia Coli*, das nur aus einem DNS-Strang besteht, nachgewiesen, daß die Replikation der DNS an einer Stelle beginnt und von dort über das ganze Chromosom abläuft (CAIRNS 1963).

Für die höheren Organismen konnte demgegenüber festgestellt werden, daß die einzelnen Chromosomen zu verschiedenen Zeiten innerhalb der S-Phase replizieren und auch innerhalb der Chromosomen die Replikation an verschiedenen Stellen zu verschiedenen Zeiten beginnt und endet. Gibt man das Isotop ^3H -Thymidin erst in den letzten 1 1/2 bis 3 Stunden der S-Phase zu, ist die relative Asynchronie der Replikation einzelner Chromosomen bzw. Chromosomensegmente am deutlichsten. Da einige Abschnitte die Replikation

bereits beendet haben, andere aber noch synthetisieren, treten Replikationnsmuster auf, die zur Identifizierung einzelner Chromosomen herangezogen werden können (Abb. 1) (LIMA DE FARIA 1961; GILBERT 1962; GERMAN 1962, 1964; SCHMID 1963; BIANCHI 1963; GEY 1966; GAVOSTO 1968).

Es sei betont, daß die Identifizierung durch Replikationsmuster nur für einige Chromosomen möglich ist. Es können die Chromosomenpaare der B- und D-Gruppe unterschieden werden, von denen jeweils ein Paar besonders stark markiert ist (GEY 1966). Auch die Chromosomen der A-Gruppe sind durch ihre Markierungsmuster zu erkennen. Die Replikationsmuster der Chromosomen der C-, E-, F- und G-Gruppe sind nicht so charakteristisch, daß sie für eine Identifizierung der einzelnen Paare ausreichen. Diese wird auch dadurch erschwert, daß homologe Chromosomen nicht die gleichen Replikationsmuster aufweisen (GERMAN 1962; KIKUCHI u. SANDBERG 1964; GEY 1966).

2.4. X-chromosomale Heterozyklie

Mit Hilfe der autoradiographischen Methode findet man in weiblichen Zellen ein Chromosom der C-Gruppe, das zu einem späteren Zeitpunkt seine DNS repliziert, als alle anderen Chromosomen (Abb. 2) (MORISHIMA 1962; GERMAN 1962; GILBERT 1962; MOOREHEAD u. DEFENDI 1963; GIANELLI 1963; GRUMBACH 1963). Da es sich um das zweite weibliche X-Chromosom handelt, wurde durch das Fehlen eines ähnlich spät replizierenden Chromosoms in männlichen Zellen und das Auftreten von mehreren spät replizierenden Chromosomen bei Probanden mit mehreren X-Chromosomen belegt (GRUMBACH 1963; GIANELLI 1963; MUKHERJEE 1964).

Unsere Untersuchung gilt diesem heterozyklischen X-Chromosom, das in der Literatur auch als "heiBes", "spät markiertes" und "spät synthetisierendes" X-Chromosom bezeichnet wird (TAYLOR 1960; GERMAN 1962; MOOREHEAD 1963; MORISHIMA 1962; GRUMBACH 1963). Für das Markierungsmuster des heterozyklischen X-Chromosoms gilt nach GAVOSTO (1967), daß sich die starke

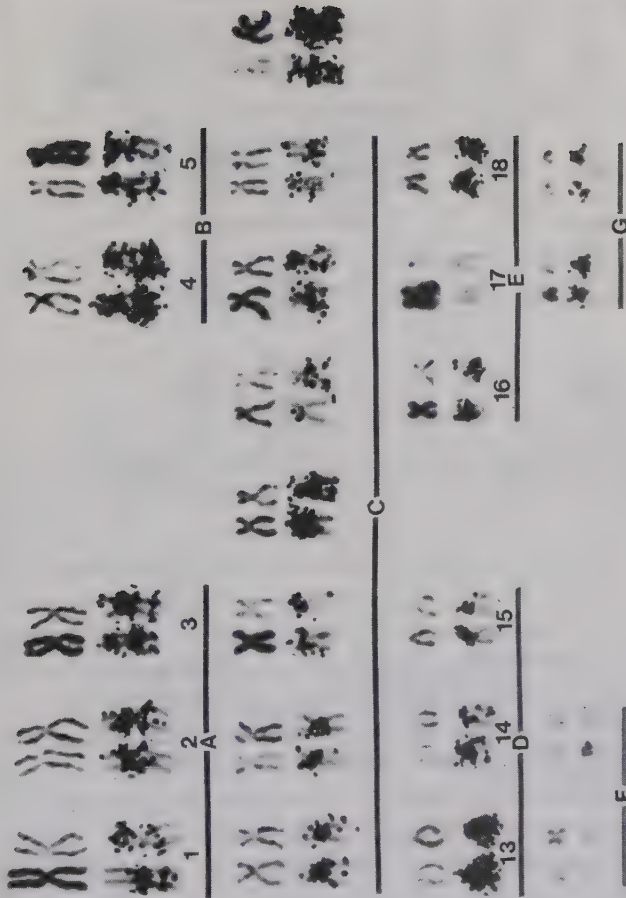


Abb. 1 Identifizierung einzelner Chromosomen durch
Autoradiographie



Abb. 2 Weibliche Metaphaseplatte mit ^3H -Thymidin markiert (links unten) und im unmarkierten Zustand (rechts unten). Starke Syntheseaktivität über dem heterozyklischen X-Chromosom (Pfeil). Karyogramm derselben Mitose (oben).

Markierung auf beide Arme erstreckt, wobei sich die stärkste Aktivität im proximalen Drittel des langen Armes befindet, das auch in sehr späten Phasen der DNS-Synthese noch markiert ist. (Fig. 2)



Fig. 2 Markierungsmuster des heterozyklischen X-Chromosoms im Verlauf der späten S-Phase

2.5. X-chromosomale Heterochromasie

Das heterozyklische X-Chromosom liegt in der Interphase in kondensiertem Zustand der Kernmembran an und läßt sich im Gegensatz zu den übrigen Chromosomen mit Kernfarbstoffen anfärben (Heterochromasie). Es dient zu Geschlechtsbestimmungen und zu Untersuchungen von Anomalien der X-Chromosomen (Barr-Körperchen, Sexchromatin) (BARR u. BERTRAM 1949).

Das Sexchromatin ist kein konstantes Phänomen. Es zeigten sich sowohl bei menschlichen Geweben in vivo als auch bei Zellkulturen hohe Prozentsätze von Sexchromatin-negativen Zellen (SCHWARZACHER 1969; COMINGS 1967). HEIL (1969) fand eine Sexchromatin-häufigkeit von durchschnittlich 54%. Einige Autoren beobachteten eine Abhängigkeit der Frequenz vom Menstruationszyklus der Frau (SCHMIDT 1966; HAGY 1972).

2.6. X-chromosomale Inaktivität

Im Unterschied zu den autosomalen Genen, die jeweils doppelt vertreten sind, sind die X-chromosomalen Gene nur im weiblichen Geschlecht doppelt, im männlichen dagegen einfach vertreten. MULLER (1947) nahm an, daß die unterschiedliche Gendosis zwischen den Geschlechtern durch einen Mechanismus der Dosis-kompensation ausgeglichen wird.

Nach der Theorie von LYON (1961, 1962, 1963, 1966) wird die Kompensation der Gendosis durch Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Soma-zellen zwischen dem 12. und 18. Tag des Blastozysten-stadiums erreicht. Die Inaktivierung betrifft zufalls-mäßig das mütterliche oder väterliche X-Chromosom. Ist die Inaktivierung in einer Zelle erfolgt, so bleibt sie in allen nachfolgenden Tochterzellen für das gleiche X-Chromosom erhalten.

Die Gültigkeit des Inaktivierungsprozesses nach der LYON-Hypothese ist durch zahlreiche Befunde über X-chromosomal gebundene Gendefekte nachgewiesen. Das trifft zu für den G-6-PDH Isomerase-Mangel (BEUTLER et al. 1962; MUKHERJEE u. SINHA 1964), die X-chromosomal rezessiv progressive Muskel-dystrophie (Typ Duchenne) (EMERY 1963; PEARSON 1963) und die X-gebundene Agammaglobulinämie (FUDENBURG u. HIRSCHHORN 1964).

2.7. Heterozyklie als Zeichen genetischer Inaktivität

Beim Maultier fand man eine Übereinstimmung zwischen genetischer Inaktivität und X-chromosomaler Hetero-zyklie. Beim Maultier kann nämlich einerseits morphologisch das väterliche vom mütterlichen X-Chromosom unterschieden werden, andererseits können elektrophoretisch unterscheidbare väterliche und mütterliche G-6-PDH Isoenzymvarianten gefunden werden. Mit Hilfe dieser Enzyme konnte nachgewiesen werden,

daß bei spät replizierendem väterlichen X-Chromosom nur das mütterliche Enzym aktiv war; das gilt auch umgekehrt (HAMERTON u. GIANELLI 1969; COHEN u. RATAZZI 1971).

3. P R O B L E M S T E L L U N G

Trotz des Nachweises der genetischen Inaktivität heterozyklischer X-Chromosomen beim Maultier, ließ sich bisher noch kein Kausalzusammenhang zwischen beiden Phänomenen beweisen. Da erst wenige X-chromosomale Enzyme zu testen sind, konnte auch noch nicht geprüft werden, ob die genetische Inaktivität für das ganze heterozyklische X-Chromosom gilt. Bei der Durchsicht der Literatur zeigt sich, daß bisher noch keine Klarheit besteht, ob jede weibliche Zelle ein spät replizierendes X-Chromosom enthält und ob die Ausprägung der Heterozyklie in gleichen Replikationsstadien bei verschiedenen Individuen konstant ist, wie das für die Inaktivität postuliert wird.

Es ist bekannt, daß die Sexchromatinbildung nicht alle Zellen betrifft und daß starke funktionsabhängige Schwankungen in der Frequenz bestehen. HEIL (1969), der die Beziehungen zwischen der Heterochromasie in der Interphase und der X-chromosomalen Heterozyklie in der späten S-Phase untersuchte, fand in allen Zellen ein spät replizierendes X-Chromosom. SCHMID (1963) sagt, daß das heterozyklische X-Chromosom in fast jeder Zelle vorhanden ist, aber auch manchmal fehlen kann. Andere Autoren berichten von dem Heterozyklieverhalten des X-Chromosoms als einem Phänomen, das individuelle Variationen in der Konstanz und Schwankungen in der Ausprägung zeigen kann (GERMAN 1962; OCKEY 1969; FITZGERALD 1971).

Wir stellten bei der Betrachtung einer großen Zahl markierter weiblicher Metaphaseplatten fest, daß

keineswegs in allen Zellen ein heterozyklisches X-Chromosom zu erkennen war.

Es war deshalb Aufgabe dieser Arbeit, durch Kontrolle an unmarkierten Metaphaseplatten zu verschiedenen Stadien der S-Phase zu prüfen, mit welcher Konstanz X-chromosomale Heterozyklie vorhanden ist. Insbesondere sollte die Richtigkeit der Heterozykliebestimmung überprüft und eine Analyse der Zellen ohne erkennbare X-chromosomale Replikationsverspätung vorgenommen werden.

4. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

4.1. Probanden

Es wurden Chromosomenpräparate aus Lymphozytenkulturen von 3 gesunden jungen Frauen untersucht. (Tab 1)

Probanden	Alter	Metaphasen gesamt	Ausgewertete Metaphasen
I	28 J	131	70
II	27 J	125	46
III	17 J	130	75
I - III		386	191

Tab. 1 Probanden und Metaphasenmaterial

Nach Entfernung des autoradiographischen Films zeigte sich, daß nur durchschnittlich 49% (37-58%) der Metaphaseplatten ausgewertet werden konnten, da die Zellen entweder unvollständig oder die Chromosomen überlagert waren.

4.2. Chromosomenpräparation

Die Chromosomenpräparation erfolgte nach der Mikromethode von ARAKAKI und SPARKES (1963). Es wurde 4 1/2 Stunden vor Abbruch der Kulturen mit ^3H -Thymidin (1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ Kultur) markiert und nach der von GEY (1966) beschriebenen Methode mit KODAK AR 10 Stripping Film autoradiographiert (Expositionszeit 14 Tage).

4.3. Kriterien der Mitosenauswahl

Wir untersuchten alle Mitosen einer Kultur, die mit Silberkörnern beladen waren. Es wurden aber die Mitosen mit den folgenden Kriterien ausgeschlossen:

- 1) Die Mitosen waren übermarkiert, d.h. sie besaßen gleich starke Markierung über allen Chromosomen, sodaß eine X-chromosomale Heterozykliebestimmung nicht möglich war.
- 2) Die Mitosen waren zu schwach markiert, d.h. es lagen nur vereinzelt Silberkörner über wenigen Chromosomen.
- 3) Die Mitosen waren sichtbar unvollständig (wegen der Überlagerung mit Silberkörnern ist die Bestimmung der genauen Chromosomenzahl im Autoradiogramm nicht immer möglich).
- 4) Die Mitosen enthielten Artefakte, die die Chromosomen überlagerten.
- 5) Die Chromosomen waren nicht genügend ausgebreitet, sodaß eine Überlagerung nicht ausgeschlossen werden konnte.
- 6) Prophasen, bei denen eine Identifizierung der langen Chromosomenfäden nicht möglich ist, wurden nicht untersucht.

4.4. Einteilung der Zellen in 3 Stadien der S-Phase

Um die Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie vergleichbar auswerten zu können, wurde schematisch anhand der Replikationsmuster von Chromosom A_1 eine

Einteilung der späten S-Phase in Früh-, Übergangs- und Spätstadium vorgenommen (SCHMID 1963; GEY 1966):

- 1) Frühstadium: Replikation über dem gesamten Chromosom, ausser dem distalen Viertel des langen Arms.
- 2) Übergangsstadium: Replikation über dem proximalen langen Arm und distalen kurzen Arm.
- 3) Spätstadium: Replikation über dem proximalen langen Arm nahe dem Zentromer.

Bei unserer Untersuchung der Zellen fanden wir keine A_1 -Chromosomen mit dem frühen Replikationsmuster mehr. Dagegen beobachteten wir Zellen mit A_1 -Mustern, bei denen eines der homologen Chromosomen Markierung nach dem Übergangsstadium und das andere homologe Chromosom Markierung nach dem Spätstadium zeigte. Zellen mit diesem A_1 -Replikationsmuster verwendeten wir zur Definition eines Mittelstadiums zwischen Übergangs- und Spätstadium. Ausserdem wurden auch Autoradiographien in einem vierten Stadium untersucht, in denen keine A_1 -Markierung erkennbar war.

Stadien von SCHMID (1963)	Früh-		Übergangs-		Spät-	
A_1 -Muster						
Stadien Modifikation nach SCHMID	1 Überg.-	2 Mittel-	3 Spät-	4 ohne M.		
A_1 -Muster						
Abbildungen						

Fig. 3 Stadieneinteilung der späten S-Phase mit Hilfe der A_1 -Replikationsmuster von SCHMID (1963) und unsere Modifikation der Methode (schematisch u. Abbildungen)

4.5. Durchführung der Untersuchungen

4.5.1. Mitosenphotographie der autoradiographierten Metaphasen

Die Auswahl der Mitosen erfolgte unter mikroskopischer Betrachtung nach den unter 4.3. genannten Kriterien. An optischer Ausrüstung stand ein LEITZ ORTHOMAT-Mikroskop mit automatisch belichtender Kamera zur Verfügung.

Die Mitosen wurden bei schwacher und mittlerer Vergrößerung (100 - 160 x) aufgesucht. Bei starker Vergrößerung (1000 x, Oelimmersion) wurde versucht, die Chromosomen zu zählen, um unvollständige Mitosen auszuschließen.

Es hat sich bewährt, die Automatik der Kamera auf 12 Din und 35% Dunkelfeld einzustellen. Für die Photographie wurde der Dokumentenfilm AGFAORTHO 25 PROFESSIONAL verwendet. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit DOKUMOL-Entwickler (5 Min.); die Abzüge wurden mit dem AGFA-Dokumentenpapier P 90 gemacht; die Positiventwicklung wurde mit DOKUMOL-Entwickler und die Fixation mit TETENAL-Fixierer vorgenommen.

Nach Photographie der Mitosen wurde die Lage jeder Mitose mit Hilfe der Tischkoordinaten bestimmt. Dadurch konnte nach Entfernung des autoradiographischen Films jede der ausgewählten Mitosen im Mikroskop wieder eingestellt werden.

4.5.2. Entfernung des autoradiographischen Films

Die Entfernung des autoradiographischen Films erfolgte nach einer Methode von BIANCHI (1965). Die Präparate wurden 2 Tage in Xylol eingelegt. Dann ließen sich die Deckgläser mühelos abheben. Das restliche Einbettungsmittel wurde durch mehrmaliges Eintauchen in Xylol beseitigt. Nach der vorsichtigen Hydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 70 und 50% je 1 Min.) und einer Wässerung in Aqua dest. für

10 Minuten erfolgte die Entfernung der Silberkörner mit photographischem Abschwächer jeweils 5 Minuten in 7,5%iger K-ferricyanidlösung und 20%iger Na-thio-sulfatlösung. Anschließend wurde wieder 1 Minute in Aqua dest. gewässert.

Nach der Entfernung der Silberkörner wurde die verbliebene Gelatineträgerschicht des autoradiographischen Films durch Hydrolyse abgelöst. Dazu wurden die Präparate 8 Minuten in 1 N HCl-Lösung von 60°C gelegt. Die HCl-Reste wurden dann durch Eintauchen in Aqua dest. entfernt.

4.5.3. Nachfärbung mit saurem Orcein

Zunächst wurde die Orceinlösung hergestellt (Anleitung von GEY, aus SCHWARZACHER 1969). 2 g Orcein werden in 100 ml 50%iger Essigsäure 30 Minuten gekocht und die Lösung anschließend filtriert.

In diese Orceinlösung wurden die Präparate bei Zimmertemperatur 30 Minuten eingelegt. Nach Abspülen der überschüssigen Farblösung durch Eintauchen in Aqua dest. für 1 Minute, wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 96 und 100% je 1 Min.) entwässert.

4.5.4. Photographie der unmarkierten mit Orcein nachgefärbten Metaphaseplatten

Die unmarkierten Mitosen wurden mit Hilfe der Tischkoordinatenwerte wieder aufgesucht, nach dem in 4.5.1. beschriebenen Verfahren photographiert und Abzüge hergestellt.

5. ERGEBNISSE

5.1. Häufigkeit der Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie

Schon bei der Betrachtung unter dem Mikroskop war nur in insgesamt 69% (59 - 73%) der Metaphaseplatten ein spät replizierendes X-Chromosom erkennbar. (Tab. 2)

Probanden	X-chrom. Heterozyklie bestimmbar		X-chrom. Heterozyklie nicht bestimmbar		gesamt
	Anzahl	%	Anzahl	%	
I	51	73	19	27	70
II	27	59	19	41	46
III	53	71	22	29	75
I - III	131	69	60	31	191

Tab. 2 Häufigkeiten der Zellen mit und ohne erkennbarer X-chromosomaler Heterozyklie

5.2. Analyse der Zellen mit heterozyklischem X-Chromosom

Nach Entfernung des autoradiographischen Films zeigte sich, daß nicht in allen mit heterozyklischem X-Chromosom bestimmten Zellen dieses richtig erkannt worden war. Insgesamt lag die Fehlerquote bei 13% (11 - 16%) (Tab. 3).

Probanden	X-chrom. Heterozyklie richtig bestimmt		X-chrom. Heterozyklie falsch bestimmt		gesamt
	Anzahl	%	Anzahl	%	
I	43	84	8	16	51
II	23	85	4	15	27
III	47	89	6	11	53
I - III	113	87	18	13	131

Tab. 3 Häufigkeiten der Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie, die richtig bzw. falsch bestimmt worden waren.

Aufgrund der Fehlbestimmungen war tatsächlich nur noch in insgesamt 59% gegenüber vorher 69% eine X-chromosomale Replikationsverspätung vorhanden. (Tab. 4)

Probanden	X-chrom. Heterozyklie		keine X-chromosomale Heteroz.		gesamt
	Anzahl	%	Anzahl	%	
I	43	61	27	39	70
II	23	50	23	50	46
III	47	63	28	37	75
I - III	113	59	78	41	191

Tab. 4 Häufigkeiten aller Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie

Als häufigste Fehlerquelle fand sich unter der stärksten Markierung ein Chromosom der D-Gruppe (8%) (Abb. 3), seltener ein Chromosom der B-Gruppe (2%) (Abb. 4). Gelegentlich lagen 2 Chromosomen unter der stärksten Markierung (3%) (Abb. 5). (Tab. 5)

Probanden	D-Chromosom heteroz.	B-Chromosom heteroz.	2 Chr. unter stärkster Markierung
I	4	1	2 x C+D 1 x C+B
II	4	-	-
III	3	2	1 x C+D
I - III	11 8%	3 2%	4 3%

% bezogen auf Gesamtzahl der mit X-chromosomaler Heterozyklie erkannten 131 Mitosen

Tab. 5 Fehlerquellen der mit X-chromosomaler Heterozyklie falsch bestimmten Zellen

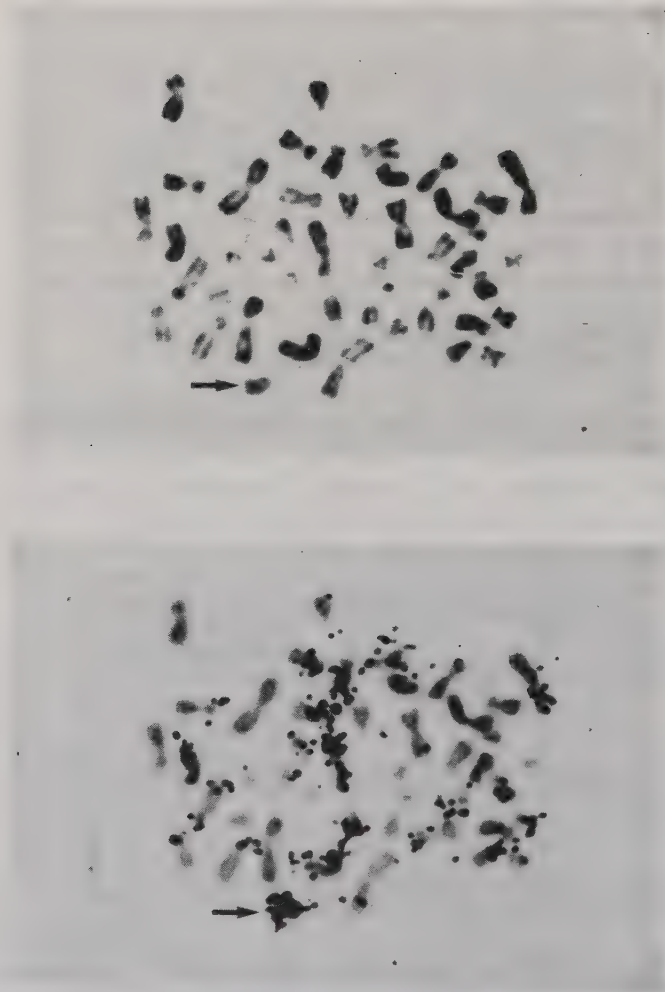


Abb. 3 Weibliche Metaphaseplatte mit falsch bestimmter X-chromosomaler Heterozyklie. Unter der stärksten Markierung (Pfeil) befindet sich ein Chromosom der D-Gruppe.



Abb. 4 Weibliche Metaphaseplatte mit falsch bestimmter X-chromosomaler Heterozyklie. Unter der stärksten Markierung (Pfeil) befindet sich ein Chromosom der B-Gruppe.

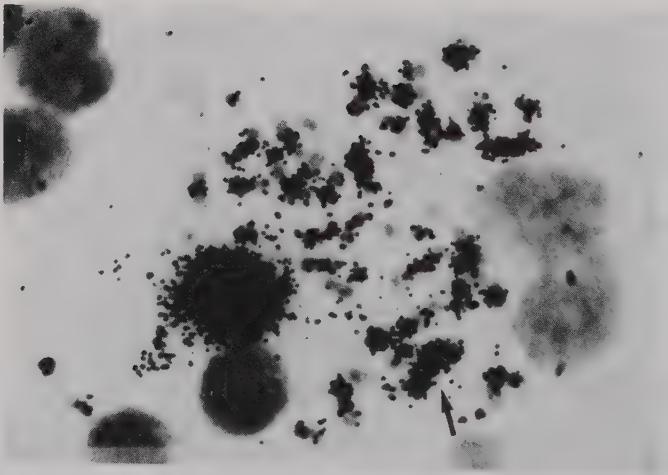
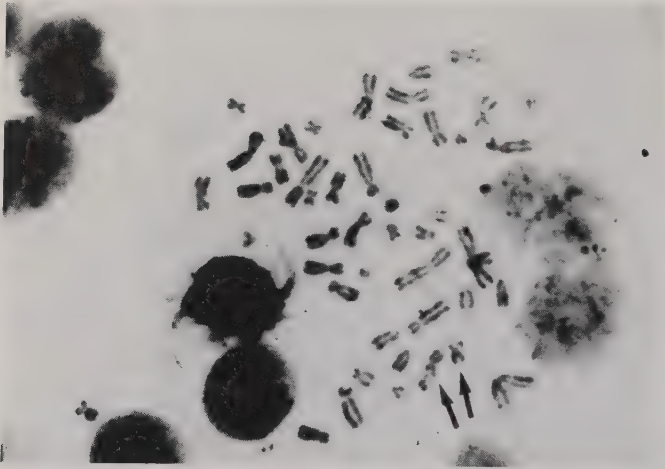


Abb. 5 Weibliche Metaphaseplatte mit falsch bestimmter X-chromosomaler Heterozyklie. Unter der stärksten Markierung (Pfeil) befinden sich 2 Chromosomen.

5.3. Analyse der Zellen ohne heterozyklisches X-Chromosom

Der Verlust des spät replizierenden X-Chromosoms konnte nicht der Grund für fehlende Heterozyklie sein, da auch in Zellen mit 45 Chromosomen in keinem Fall ein Chromosom der C-Gruppe fehlte (Tab. 6).

Probanden	45 Chromos.	46 Chromos.	gesamt
I	9	61	70
II	4	42	46
III	11	64	75
I - III	24	167	191

Tab. 6 Anzahl der Zellen mit 45 bzw 46 Chromosomen

Aus mehreren anderen Gründen konnte eine X-chromosomale Heterozyklie nicht bestimmt werden. Es fanden sich in 47% Zellen, die mehrere spät replizierende Chromosomen der C-Gruppe besaßen, sodaß nicht entschieden werden konnte, welches das X-Chromosom war. Diese Zellen bezeichneten wir als Typ 1. Ebenso häufig (47%) waren Zellen, in denen Chromosomen anderer Gruppen neben Chromosomen der C-Gruppe spät replizierend waren, sodaß die Definition der "X-chromosomalen Heterozyklie" nicht gegeben war. Diese Zellen benannten wir mit (Abb. 6) Typ 2. Seltener (6%) waren Zellen, in denen kein Chromosom der C-Gruppe, jedoch 1 oder mehrere Chromosomen anderer Gruppen spät replizierend waren. Für diese Zellen führten wir Typ 3 ein. (Tab. 7)

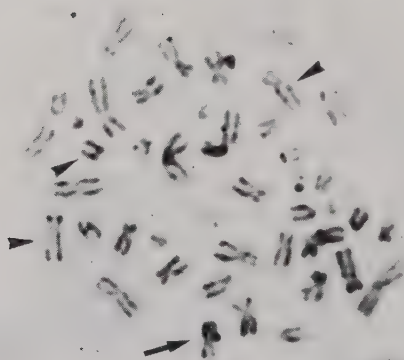


Abb. 6 Weibliche Metaphaseplatte mit gleich starker Markierung über dem heterozyklischen X-Chromosom ($\longrightarrow$) und über Chromosomen anderer Gruppen ($\blacktriangleright$).

Probanden	Typ 1	Typ 2	Typ 3	gesamt
I	6	1 x C+D 2 x C+2D 3 x 2C+D 2 x C+D+B 2 x C+B	2 x D 1 x D+B	
	6 32%	10 52%	3 16%	19
II	6	2 x C+D 4 x 2C+D 3 x C+D+B 1 x C+B 1 x 2C+B 1 x C+A	1 x 2D+A	
	6 32%	12 64%	1 5%	19
III	16	2 x C+D 2 x C+2D 1 x C+D+B 1 x C+B		
	16 73%	6 27%		22
I - III	28 47%	28 47%	4 6%	60

Tab. 7 Analyse der Zellen ohne heterozyklisches X-Chromosom

5.4. Zuordnung der Zellen zu einem Stadium der späten S-Phase der DNS-Synthese

5.4.1. Aufschlüsselung aller Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie

Die Aufschlüsselung der Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie hinsichtlich der Stadien der DNS-Synthese ergab, daß sich die meisten Zellen im Stadium 3 der S-Phase befanden, die sich in etwas mehr Zellen ohne (51%) als mit (44%) X-chromosomaler Replikationsverspätung aufteilten. Im Stadium 2 waren gleich viel Zellen mit und ohne heterozyklischem X-Chromosom zu beobachten (22%). In den Stadien 1 und 4 waren etwas mehr Zellen mit (15 bzw. 19%) als ohne (12 bzw. 15%) X-chromosomaler Heterozyklie zu finden. (Tab. 8)

Markierungsmuster d. A ₁ -Chromosomen	mit X-chrom. Heterozyklie		ohne X-chrom. Heterozyklie	
	Anz.	%	Anz.	%
 Stadium 1	17	15	9	12
 Stadium 2	25	22	17	22
 Stadium 3	50	44	40	51
 Stadium 4	21	19	12	15

Tab. 8 Zuordnung aller Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie zu einem Stadium der späten S-Phase mit Hilfe der Markierungsmuster der A₁-Chromosomen

In der folgenden Graphik soll verdeutlicht werden, daß sich die Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie etwa zu gleich hohen Anteilen in denselben Stadien der DNS-Synthese befanden. Es fällt dabei besonders auf, daß die Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie nicht auf besonders späte Stadien beschränkt waren (Fig. 4).

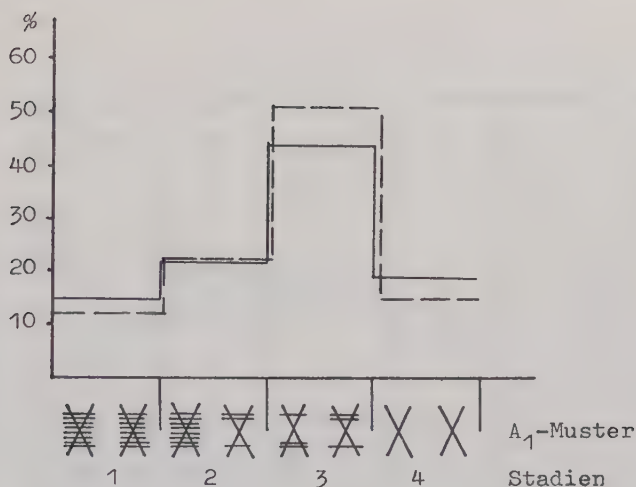


Fig. 4 Prozentualer Anteil von Zellen mit (—) und ohne (---) X-chromosomaler Heterozyklie bezogen auf 4 Stadien der späten S-Phase

5.4.1.1. Aufschlüsselung der Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie für die drei Probanden (Tab. 9) (Fig. 5)

Die Aufschlüsselung der Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie für die 3 Probanden zeigte auffallend starke Unterschiede. Im Gegensatz zu den Probanden I und III fand sich bei Proband II keine Häufung von Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie im Stadium 3. Es lagen gleich viel Zellen (26%) wie im Stadium 2 vor. Im Stadium 1 waren etwa gleich viel (18%), im Stadium 4 mehr Zellen (30%) als bei den anderen beiden Probanden vorhanden.

Bei Proband III dagegen befanden sich am wenigsten Zellen im Stadium 1 (11%), fast doppelt soviel im Stadium 2 (21%). Von den 3 Probanden beobachteten wir bei Proband III im Stadium 3 die meisten (53%), dagegen im Stadium 4 wenig Zellen (16%). Für Proband I waren ähnliche Werte wie bei Proband III festzustellen (Tab. 9) (Fig. 5).

Markierungsmuster des X-Chromosoms

Markierungsmuster d. A ₁ -Chromosomen	Mitosen mit heterozyklischem X-Chromosom						Mitosen ohne heterozyklisches X-Chromosom					
	I		II		III		I		II		III	
	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%
 Stadium 1	8	19	4	18	5	11	1	4	4	17	4	14
 Stadium 2	9	21	6	26	10	22	7	26	4	17	6	22
 Stadium 3	19	44	6	26	25	53	15	55	12	53	13	46
 Stadium 4	7	16	7	30	7	14	4	15	3	13	5	18

Tab. 9 Zuordnung aller Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie zu einem Stadium der späten S-Phase mit Hilfe der Markierungsmuster der A₁-Chromosomen

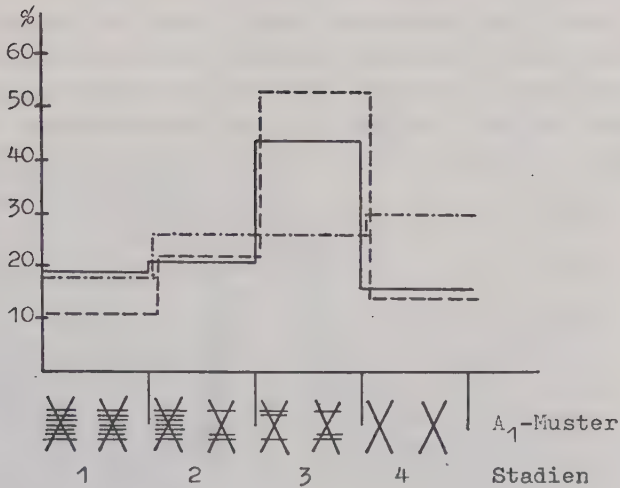


Fig. 5 Prozentualer Anteil der Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie für die 3 Probanden I (—), II (---) und III (-.-) bezogen auf 4 Stadien der späten S-Phase

5.4.1.2. Aufschlüsselung der Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie für die drei Probanden (Tab. 9)

Die Aufschlüsselung der Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie ergab für die drei Probanden eine annähernd gleiche Verteilung über die 4 Stadien der späten S-Phase, die derjenigen der Gesamtverteilung aller Zellen (s. 5.4.1.) entsprach. Insbesondere war bei allen drei Probanden die gleiche Anhäufung von Zellen im Stadium 3 wie unter 5.4.1. zu beobachten. (Fig. 6)

5.4.2. Zellen mit falsch bestimmter X-chromosomaler Heterozyklie

Es wurde der Versuch gemacht, auch die falsch bestimmten Zellen in die Stadien der späten S-Phase einzuordnen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Fehlbestimmungen an ein bestimmtes Stadium gebunden waren.

Diese Vermutung konnte ausgeschlossen werden, da sich die falsch bestimmten ähnlich wie die gesamten Zellen (5.4.1.) auf die 4 Stadien verteilen ließen. Allerdings sollte dieses Ergebnis nicht überbewertet werden, da nur 18 Zellen für diese Untersuchung zur Verfügung standen.

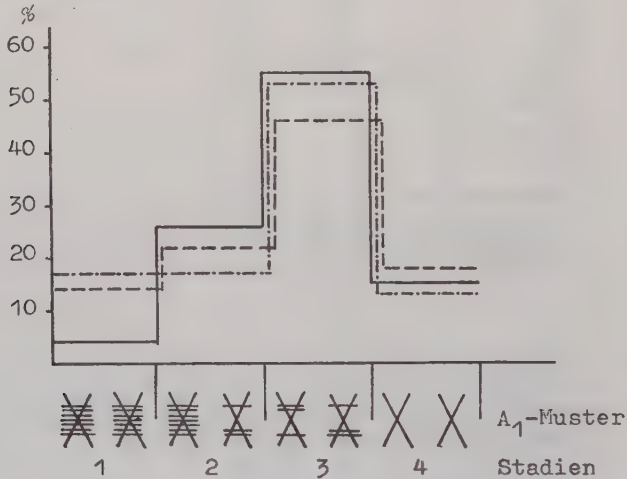


Fig. 6 Prozentualer Anteil der Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie für die 3 Probanden I (—), II (---) und III (-·-·-) bezogen auf 4 Stadien der späten S-Phase

5.5. Nebenbefund: Auffallendes Markierungsmuster eines weiteren Chromosoms der C-Gruppe

Bei der Auswertung der Mitosen ohne X-chromosomale Heterozyklie fiel oft ein Chromosom der C-Gruppe auf, das relativ spät markiert war, sich aber durch ein anderes Markierungsmuster vom heterozyklischen X-Chromosom abgrenzen ließ.

Die Markierung betrifft die beiden kurzen Arme, die Zentromerregion und die proximalen Enden der langen Arme (Abb. 7 u. Abb. 8). Es soll von uns mit der Bezeichnung "C"-Chromosom benannt werden.

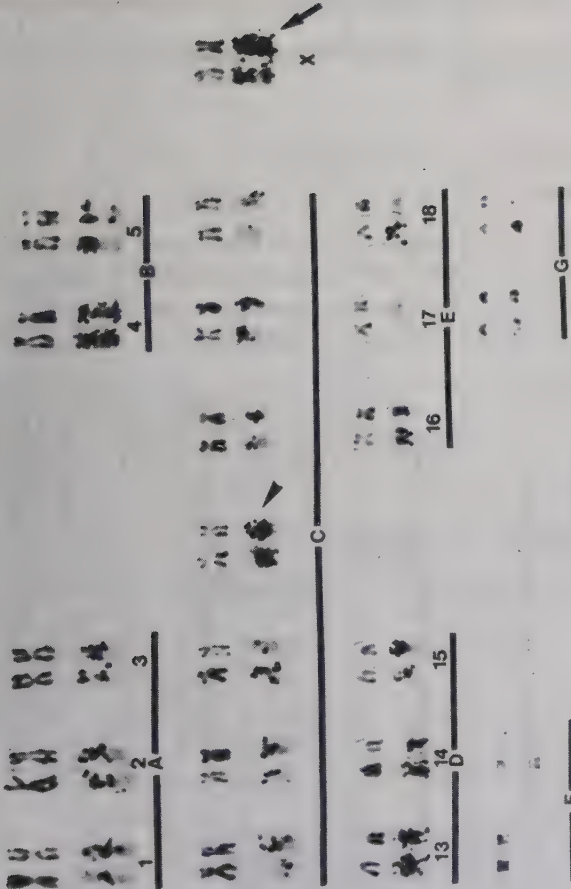


Abb. 7 Weibliche Metaphaseplatte mit auffallend markiertem Chromosom der C-Gruppe ("C"-Chromosom ►)



Abb. 8 Beispiele von Markierungsmustern des "C"-Chromosoms

5.5.1. Häufigkeit des "C"-Chromosoms bei den drei Probanden

Das "C"-Chromosom war nicht nur in Zellen ohne (44%) sondern auch in Zellen mit spät replizierendem X-Chromosom vorzufinden (56%). Es lag bei den drei Probanden mit auffallend gleicher Häufigkeit vor (52, 54 u. 56%). (Fig. 7 u. Tab. 10)

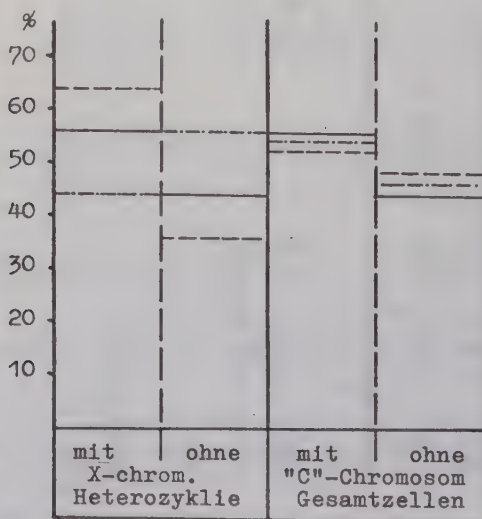


Fig. 7 Häufigkeitsverteilungen des "C"-Chromosoms sowohl in Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie als auch in der Gesamtzellzahl für die 3 Probanden I (—), II (---) u. III (----)

Probanden	"C"-Chromosom in Zellen				Gesamtzahlen Zellen			
	mit X-chrom. Heterozyklie		ohne X-chrom. Heterozyklie		mit "C"-Chr.		ohne "C"-Chr.	
	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%
I	22	56	17	44	39	56	31	44
II	11	44	14	56	25	54	21	46
III	25	64	14	36	39	52	36	48
I - III	58	56	45	44	103	54	88	46

Tab. 10 Häufigkeiten des "C"-Chromosoms in Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie, sowie die Gesamtzahlen für Zellen mit und ohne "C"-Chromosom

5.5.2. Zuordnung des "C"-Chromosoms zu den 4 Stadien der späten S-Phase (Tab. 11)

Die Häufigkeitsverteilung des "C"-Chromosoms auf die 4 Stadien der späten S-Phase war bei den 3 Probanden annähernd gleich und entsprach sowohl der Verteilung der gesamten Zellen (5.4.1.) als auch der Verteilung der Zellen ohne spät replizierendem X-Chromosom (5.4.1.2.).

Damit wich die bereits beschriebene Häufigkeitsverteilung der Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie (5.4.1.1.) von Proband II auch gegenüber der des "C"-Chromosoms ab. Bei den Probanden I und III fanden sich übereinstimmende Werte. Das Markierungsmuster des "C"-Chromosoms kann daher als Referenz für die Markierung der Autosomen ausschließlich des heterozyklischen X-Chromosoms herangezogen werden.

Dieser Befund soll in den folgenden Diagrammen der Häufigkeitsverteilungen von Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie und der des "C"-Chromosoms für alle drei Probanden verdeutlicht werden (Fig. 8, Fig. 9 u. Fig. 10).

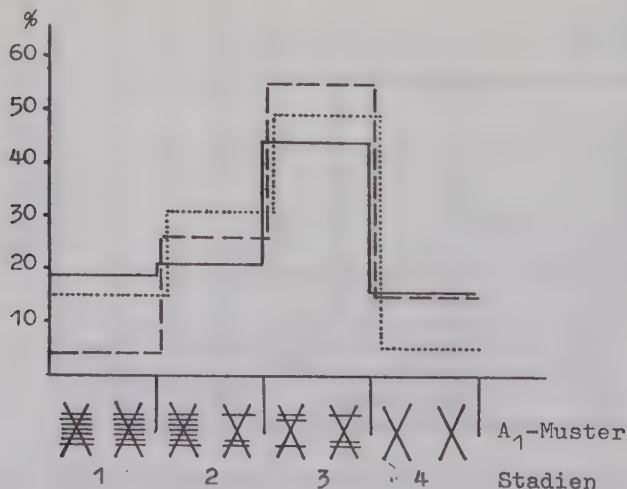


Fig. 8 Häufigkeitsverteilungen der Zellen mit (—) und ohne (---) X-chromosomaler Heterozyklie und der des "C"-Chromosoms (.....) bei Proband I bezogen auf vier Stadien der späten S-Phase

Metaphaseplatten der 3 Probanden mit dem "C"-Chromosom									
Markierungs- muster d. A ₁ - Chromosomen	I		II		III		I - III		
	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	
	6	15	5	20	7	18	18	17	
Stadium 1									
	12	31	7	28	10	26	29	28	
Stadium 2									
	19	49	9	36	17	43	45	44	
Stadium 3									
	2	5	4	16	5	13	11	11	
Stadium 4									

Tab. 11 Zuordnung des "C"-Chromosoms zu 4 Stadien der späten S-Phase für die 3 Probanden

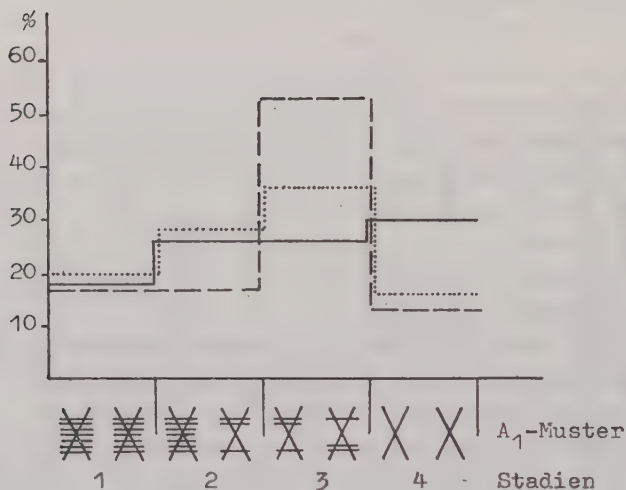


Fig. 9 Häufigkeitsverteilungen der Zellen mit (—) und ohne (---) X-chromosomaler Heterozyklie und der des "C"-Chromosoms (.....) bei Proband II bezogen auf vier Stadien der späten S-Phase

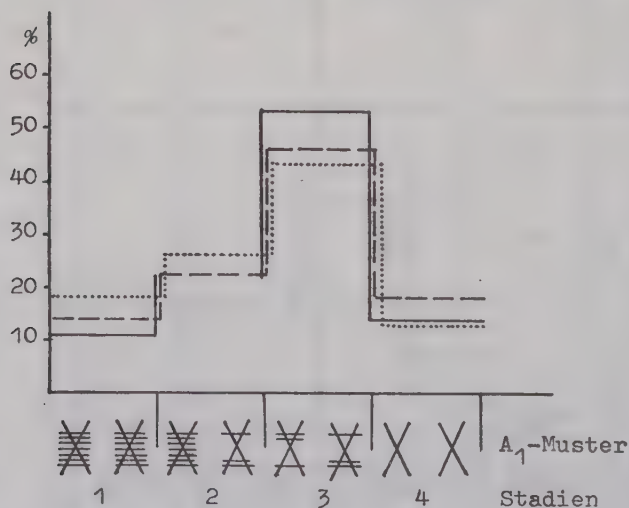


Fig. 10 Häufigkeitsverteilungen der Zellen mit (—) und ohne (---) X-chromosomaler Heterozyklie und der des "C"-Chromosoms (.....) bei Proband III bezogen auf vier Stadien der späten S-Phase

6. DISKUSSION

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die Heterozyklie kein konstantes Merkmal des 2. weiblichen X-Chromosoms ist, wie die Inaktivitätshypothese vermuten ließ. Im folgenden sollen die Ergebnisse kritisch diskutiert, mit Angaben aus der Literatur verglichen und ihre Bedeutung besprochen werden.

6.1. Allgemeine Fehlerquellen der Autoradiographie

Die Chromosomenautoradiographie ist eine relativ grobe Methode. Man nutzt die bei dem Tritiumzerfall von inkorporiertem ^3H -Thymidin freiwerdende β -Strahlung, um die Orte der späten DNS-Synthese darzustellen. Die β -Strahlung hat aber nicht bei jedem Zerfall die gleiche Initialenergie und dadurch unterschiedliche Reichweite. Aufgrund der insgesamt geringen Reichweite der β -Strahlen tragen nur Zerfälle aus den obersten Schichten der Chromosomen zu einer Schwärzung des Films bei. Zerfälle aus tieferen Schichten werden durch Selbstabsorption nicht wirksam. Außerdem verläuft ein großer Teil der β -Strahlung in nicht nutzbare Richtungen.

Es muß auch mit Fading (Verschwinden latenter Bildkeime durch Reoxydation während der autoradiographischen Prozedur) und Chemographie (Entstehen von Silberkörnern ohne zugrundeliegenden radioaktiven Zerfall) gerechnet werden. Ebenso tritt eine Variabilität bei den Entwicklungsprozessen auf.

Diese allgemeinen Fehlerquellen der Autoradiographie sollten allerdings zufällig sein und alle Chromosomen einer Mitose mit gleicher Wahrscheinlichkeit betreffen. Eine selektive Beeinflussung der X-chromosomalen Heterozyklie ist nicht anzunehmen.

6.2. Kritische Stellungnahme zu den eigenen Ergebnissen

6.2.1. Hohe Prozentzahlen fehlender X-chromosomaler Heterozyklie

6.2.1.1. Vergleich mit Angaben in der Literatur

Wir stellten hohe Prozentzahlen von Mitosen ohne X-chromosomale Heterozyklie fest. Der durchschnittliche Wert lag bei den von uns untersuchten 3 Probanden (191 Zellen) bei 41% (37-50%). Einen ähnlichen Wert gibt FITZGERALD (1971) an, der bei 4 gesunden Probanden 282 Zellen untersuchte und in durchschnittlich 39% (24-64%) kein spät replizierendes X-Chromosom fand.

Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von HEIL (1969), der in allen 156 Metaphaseplatten von 3 Probanden ein heterozyklisches X-Chromosom nachwies. Aufgrund dieses Befundes wertete er die X-chromosomale Replikationsverspätung als konstante Eigenschaft des X-Chromosoms im Gegensatz zur Sexchromatinbildung in der Interphase.

Der von HEIL angegebene Wert von 54% Sexchromatinpositiver Interphasekerne (Fibroblasten) entspricht der von FITZGERALD und uns beobachteten durchschnittlichen Frequenz von Metaphaseplatten mit heterozyklischem X-Chromosom (61% bzw. 59%).

Bei GERMAN (1962) und SCHMID (1963), die ebenfalls Schwankungen in der Konstanz der X-chromosomalen Heterozyklie feststellten, sind unterschiedliche quantitative Angaben zu finden. Beide untersuchten das Material von jeweils 4 gesunden Frauen (neben anderen Probanden); während GERMAN 38 weibliche Zellen karyotypierte, sind bei SCHMID keine Zellzahlen zu finden.

6.2.1.2. Überprüfung der Auswahlkriterien

Quantitative Angaben über die Konstanz der X-chromosomalen Heterozyklie sind stark abhängig von den Auswahlkriterien. Wir haben für unsere Untersuchungen

strenge Kriterien verwendet:

Es wurden alle Mitosen mit deutlicher Chromosomenmarkierung erfaßt, sofern sie nicht zu sehr stark markierten Frühstadien bzw. sehr schwach markierten Spätstadien gehörten, die definitionsgemäß keine X-chromosomale Heterozyklie aufweisen (GERMAN 1964, s. 6.2.2.1.). Durch Kontrolle nach Entfernung der Silberkörner wurde gewährleistet, daß nur Zellen mit vollständigem Chromosomensatz und Zellen mit 45 Chromosomen (13%), bei denen das fehlende Chromosom nicht aus der C-Gruppe stammte, in die Auswertung kamen. So ließen sich bei den unmarkierten Mitosen auch Artefakte ausschließen. Außerdem wurden solche Zellen nicht ausgewertet, in denen die Chromosomen wegen ungenügender Ausbreitung nicht individuell zu unterscheiden waren.

HEIL (1969) gibt sehr ähnliche Auswahlkriterien an. Er untersuchte Mitosen mit 44-46 Chromosomen, die für eine individuelle Unterscheidung genügend ausgebreitet sein mußten. Auch mußte die Markierung ausreichend sein, da in Zellen aus dem Z-Intervall (nach GERMAN 1964) das heterozyklische X-Chromosom seine Synthese bereits beendet hat und wenige Silberkörner über den Chromosomen keine Aussage zulassen.

FITZGERALD (1971) berichtet nur von Background-Problemen an den markierten Zellen. Er wertete deshalb nur Zellen aus, in denen die Chromosomen eine mindestens doppelt so starke Markierung wie der Background aufwiesen. Bei GERMAN (1962) und SCHMID (1963) finden sich keine Angaben über Auswahlkriterien für die Bewertung von Zellen.

6.2.1.3. Bewertung

Die Überprüfung des Befundes der hohen Prozentzahlen von Zellen ohne spät replizierendes X-Chromosom hat keinen Anhalt für Fehlerquellen gegeben. Die von FITZGERALD (1971) und uns beobachteten hohen Werte

können wir nicht erklären, zumal wir ähnliche Zell- und Probandenzahlen und fast die gleichen Auswahlkriterien wie HEIL (1969) hatten, der dagegen in allen Zellen ein heterozyklisches X-Chromosom fand. Wir halten unsere Werte trotzdem für reell.

Die von FITZGERALD erwähnten Background-Probleme traten bei uns nicht auf, weil bei einer 14-tägigen Expositionszeit große Silberkörner erzeugt wurden, die sich von den kleineren Background-Silberkörnern deutlich abgrenzen ließen.

6.2.2. Auftreten von Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie in allen untersuchten Stadien der DNS-Synthese

Die Analyse der Zellen ohne erkennbare X-chromosomale Heterozyklie ergab, daß sie nicht auf das späteste Stadium der DNS-Synthese beschränkt waren.

6.2.2.1. Kriterien für die Stadieneinteilung der späten S-Phase (Fig. 11)

Kriterien für die Definition der Stadien der späten S-Phase wurden von GERMAN (1964) und SCHMID (1963) aufgestellt.

GERMAN unterteilt die späte S-Phase in 6 Intervalle von U - Z (Tab. 12). Es wird dabei der Markierungsstatus der ganzen Mitose bewertet. Nur in den Intervallen W - Y tritt das spät replizierende X-Chromosom als heterozyklisches Chromosom in Erscheinung. (Fig. 11)

SCHMID teilt die späte S-Phase in 3 Stadien ein: Früh-, Übergangs- und Spätstadium. Er bedient sich der Markierungsmuster der morphologisch gut zu identifizierenden A_1 -Chromosomen. (Fig. 11) Auch HEIL (1969) verwendete die Methode von SCHMID, um die Zellen in ein Stadium der DNS-Synthese einzuordnen.

FITZGERALD (1971) nahm eine Einteilung der späten S-Phase mit Hilfe der Markierungsmuster der Chromosomen der G-Gruppe vor. Er unterschied 5 Stadien von

dem Stadium der Markierung aller 4 G-Chromosomen (4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4) bis zu dem Stadium, in dem kein G-Chromosom mehr markiert war. (Fig. 11)

Für die Auswertung unseres Materials bedienten wir uns der Methode von SCHMID. Mit dieser Einteilung war in den Frühstadien wegen der generellen starken Markierung das heterozyklische X-Chromosom in unserem Zellmaterial noch nicht erkennbar. Wir differenzierten deswegen die Stadieneinteilung von SCHMID durch Einfügen eines Mittelstadiums (Stad. 2) zwischen Übergangs- (Stad. 1) und Spätstadium (Stad. 3). Ein noch hinzugefügtes 4. Stadium betraf Zellen ohne A₁-Markierung, in dem auch noch spät replizierende X-Chromosomen festgestellt werden konnten (s.o. S. 12). (Fig. 11)

Methoden	keine X-chr. Heterozyklie		Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie					keine X-chromosom. Heteroz.
Intervalle v. GERMAN ganze Zelle	U	V	W	X	Y			Z
Stadien von SCHMID	Früh- 		Übergangs- 		Spät- 			
A ₁ -Muster								
Stadien von FITZGERALD			1	2	3	4	5	
G-Chr.-Muster			4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	
Modifikation nach SCHMID			1	2	3	4		
Stadien			Überg.	Mittel-	Spät-	ohneM		
A ₁ -Muster								

Intervalle nach GERMAN (1964), zitiert von PASSARGE, aus SCHWARZACHER (1969)

Stadien nach SCHMID (1963), von PASSARGE aus SCHWARZACHER (1969)

Fig. 11 Methoden zur Bestimmung der Stadien/Intervalle der späten S-Phase der DNS-Synthese

Tab. 12 Definition des Replikationsstadiums von 6 Zeitintervallen der letzten 3 Stunden der S-Phase (nach GERMAN 1954, zitiert von PASSARGE, aus SCHWARZACHER 1969)	
Intervall	Definition
U	Der früheste Punkt der DNS-Synthese, in dem sichtbare Chromosomensegmente die DNS-Synthese beendet haben.
V	Viele Regionen in multiplen Chromosomensegmenten beenden die Replikation: das Replikationsmuster erscheint komplex.
W	Wie V, jedoch wird die späte Replikation eines X-Chromosoms in weiblichen Zellen erkennbar.
X	Einzelne Chromosomen replizieren noch immer intensiv in bestimmten Segmenten: eines der X-Chromosomen in weiblichen Zellen, 2 Chromosomen der B-Gruppe, der D-Gruppe, der G-Gruppe, Paar 16, 18, das Y-Chromosom in männlichen Zellen, kleinere Areale von DNS-Synthese über anderen Chromosomen.
Y	In weiblichen Zellen kontinuierliche DNS-Replikation eines X-Chromosoms.
Z	Minimale Synthese, sichtbar durch seltene scheinbar ungleichmäßige Silberkörner über mehreren Chromosomen des Komplements, ohne intensive Synthese über einem bestimmten Chromosomensegment.

Beim Vergleich der Methoden zur Stadieneinteilung der Zellen innerhalb der späten S-Phase zeigen sich die folgenden Vor- und Nachteile:

Der Vorteil der Methode von GERMAN liegt darin, daß Schwankungen durch asynchrone Replikation homologer Chromosomen die Stadieneinteilung weniger stark beeinflussen, als bei der Methode von SCHMID. Andererseits läßt sich mit Hilfe der A_1 -Markierung eine raschere und eindeutige Stadieneinteilung der Zellen vornehmen, die für die Beurteilung der Konstanz der Heterozyklie nötig ist.

Wir verwendeten wie HEIL die Methode der A_1 -Markierungsmuster von SCHMID, weil nach unserer Erfahrung die Gesamtmarkierung der Zelle mit der A_1 -Markierung gut übereinstimmt. Diese Methode wurde auch von GEY (1966) bei

der Beurteilung von DNS-Replikationsmustern der Chromosomengruppen B, D und G bevorzugt. Allerdings sollte die Methode wegen der bekannten Variabilität der A_1 -Chromosomen nicht zu schematisch durchgeführt werden.

Die Methode von FITZGERALD schien uns nicht angebracht, da im Gegensatz zu den A_1 -Chromosomen die G-Chromosomen aufgrund ihrer geringen Größe nicht immer sicher zu identifizieren waren.

6.2.2.2. Bewertung

Die meisten untersuchten Zellen befanden sich im Stadium 3 der späten S-Phase, wobei Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie gleiche Häufigkeit aufwiesen (Fig. 4). Dieser Befund könnte dadurch erklärt werden, daß im Stadium 3 der von GILBERT et al. (1965) beschriebene steile Abfall der Syntheseaktivität über dem heterozyklischen X-Chromosom stattfindet (Fig.12).

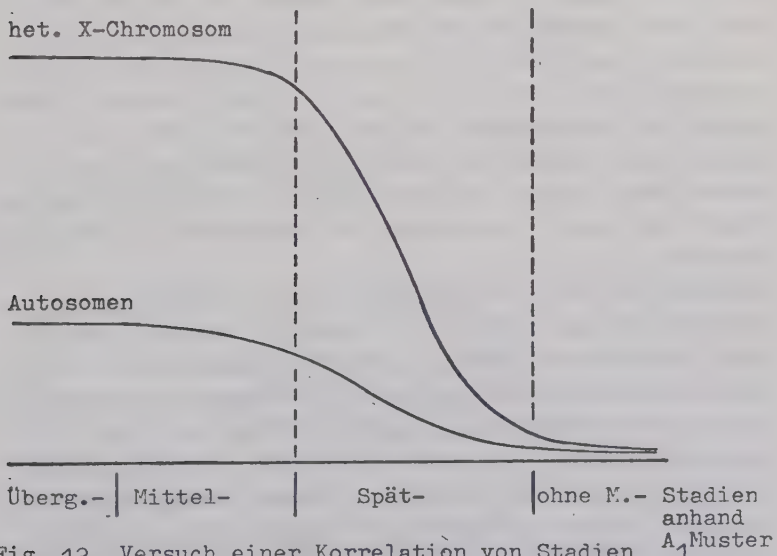


Fig. 12 Versuch einer Korrelation von Stadien der späten S-Phase zu den Markierungsmustern von Autosomen und dem heterozyklischen X-Chromosom in Anlehnung an GILBERT et al. (1965)

Dies erklärt jedoch nicht, daß sich auch im Stadium 1 und 2 Zellen ohne und im Stadium 4 Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie befanden. Wie in Fig. 4 dargestellt, war die Häufigkeit von Zellen mit und ohne spät replizierendem X-Chromosom in allen Stadien annähernd gleich.

Wenn die Heterozyklie eine konstante Eigenschaft des 2. weiblichen X-Chromosoms wäre, müßten sich Zellen mit und ohne X-chromosomaler Replikationsverspätung auf jeweils gleiche Stadien beziehen, d.h. es dürften sich zumindest im Stadium 1 keine Zellen ohne und im Stadium 4 keine Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie befinden.

Die Befunde widersprechen der Annahme einer Konstanz der X-chromosomalen Heterozyklie und lassen auf eine Variabilität der Replikationsverspätung schließen, vorausgesetzt, daß die A_1 -Markierungsmuster ein sicheres Bezugssystem für die DNS-Replikation bilden. Die abweichende Häufigkeitsverteilung von Zellen mit und ohne X-chromosomaler Replikationsverspätung bei Proband 2 gegenüber den Probanden 1 und 3 (Fig. 5 u. 6) weist daraufhin, daß neben der intraindividuellen auch eine interindividuelle Variabilität vorhanden sein kann. Aufgrund des vorliegenden Materials kann nicht entschieden werden, ob es sich um eine konstitutionelle oder funktionelle Abweichung des Heterozyklieverhaltens handelt.

FITZGERALD (1971) verwendete das spät replizierende X-Chromosom als unabhängige Landmarke bei dem Versuch, die G-Chromosomen durch ihr Markierungsmuster zu identifizieren. Dabei wurde bei abnehmender G-Chromosomenmarkierung eine Zunahme von Zellen mit (Fig. 13) und eine Abnahme von Zellen ohne (Fig. 14) X-chromosomaler Heterozyklie gefunden. Dieser Befund widerspricht unserer Beobachtung von einer gleichen Häufigkeitsverteilung von Zellen mit und ohne X-chromosomaler Replikationsverspätung im Verlauf der späten S-Phase (intraindividuelle Variabilität). Übereinstimmend mit

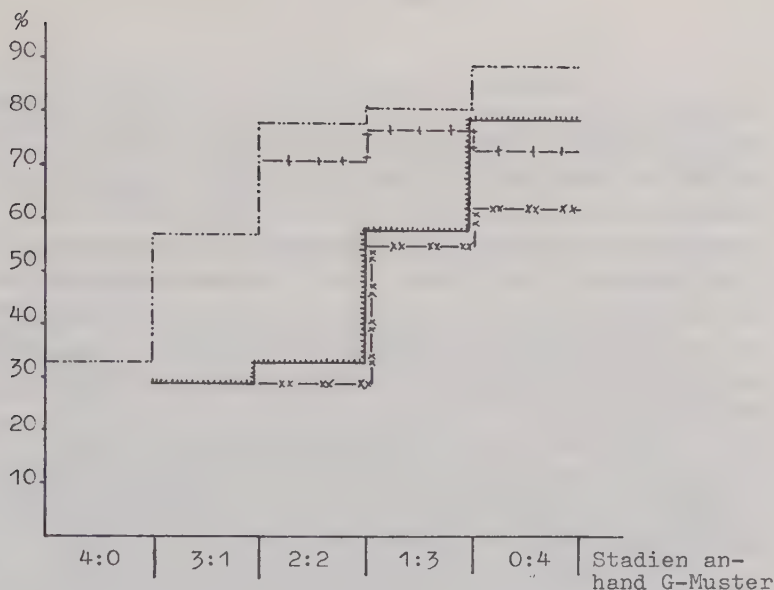


Fig. 13 Prozentualer Anteil von Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie für 4 Probanden II (---x---), III (-----), IV (-+-+), u. V (~~~~~) nach FITZGERALD (1971)

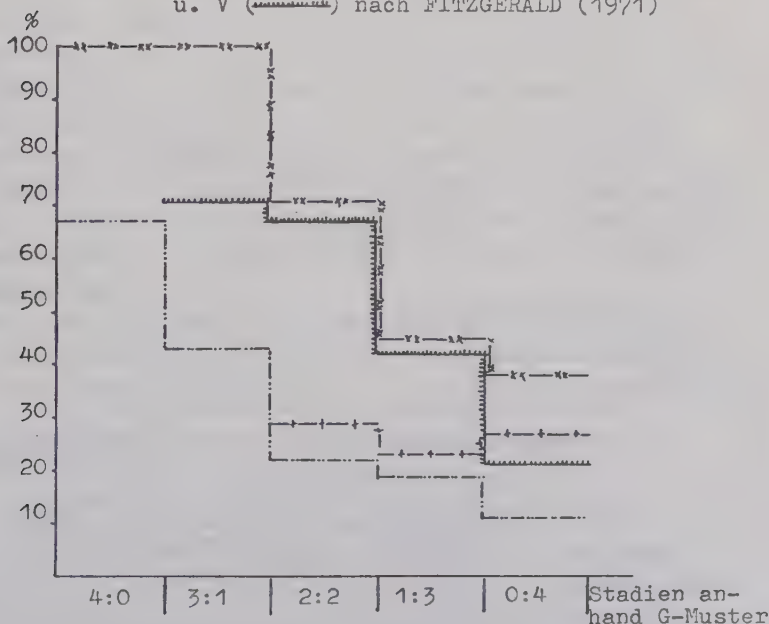


Fig. 14 Prozentualer Anteil von Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie für 4 Probanden II (---x---), III (-----), IV (-+-+), u. V (~~~~~) n. FITZGERALD (1971)

unseren Befunden stellte FITZGERALD, wie aus den Figuren 13 u. 14 ersichtlich, unterschiedliche Häufigkeiten von Zellen mit und ohne X-chromosomaler Heterozyklie in den einzelnen Stadien zwischen den von ihm untersuchten 4 Normalpersonen fest (interindividuelle Variabilität). Die Probanden 2 und 5 bzw. 3 und 4 wiesen Ähnlichkeiten in den Verteilungen auf. Es soll noch darauf hingewiesen werden, daß FITZGERALD seine Untersuchungen an Leukozytenkulturen durchführte, wir dagegen Lymphozytenkulturen verwendeten.

HEIL (1969) fand bei 2 Fibroblastenkulturen deutliche Unterschiede in der Verteilung der von ihm untersuchten 3 Stadien der späten S-Phase (Fig. 15). Allerdings erklärt dieser Befund nicht, daß HEIL in allen untersuchten Zellen ein spät replizierendes X-Chromosom beobachtete.

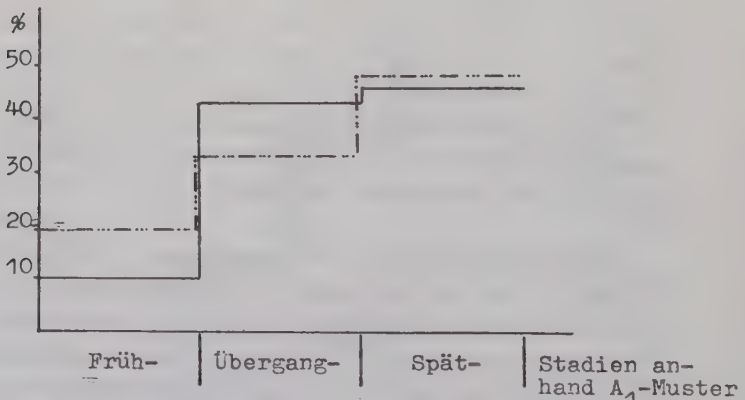


Fig. 15 . Prozentualer Anteil von Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie für 2 Probanden I (-----) u. II (——) nach HEIL (1969)

6.2.3. Andere spät replizierende Chromosomen

Neben dem heterozyklischen X-Chromosom sind auch Chromosomen der B-, C- und D-Gruppe spät replizierend (GERMAN 1964; KIKUCHI u. SANDBERG 1964; GEY 1966).

6.2.3.1. Identifizierung spät replizierender Chromosomen

Das spät replizierende Chromosomenpaar der B-Gruppe wird als Nr. 4, das der D-Gruppe als Nr. 13 bezeichnet (GEY 1966). In der C-Gruppe ist möglicherweise das von SCHMID (1963) als "kaltes" bezeichnete 2. weibliche X-Chromosom auch spät replizierend.

Da die Kontrolluntersuchungen im vorliegenden Material an konventionell (Orcein) gefärbten Chromosomen durchgeführt wurden, konnte nicht überprüft werden, ob es sich bei dem als heterozyklisch bezeichneten C-Chromosom immer um ein X-Chromosom handelt.

Eine genaue Identifizierung der unter den Silberkörnern liegenden Chromosomen ist prinzipiell nur durch die Anwendung von Bandentechniken möglich (CASPERSSON 1970; SUMNER 1971). Korrelationen von Bandenmustern und spät replizierenden Chromosomenabschnitten wurden sowohl von GANNER u. EVANS (1971) als auch von CALDERON u. SCHNEDL (1973) durchgeführt. Die Autoren gingen jedoch nicht auf die Frage der Konstanz von mit Banden nachgewiesener X-Chromosomen unter den starken Silberkornanhäufungen ein.

Da technische Schwierigkeiten bei der Bandenfärbung nach vorangegangener Autoradiographie bestanden, mußten wir bei der Kontrolle auf eine Bandenanalyse verzichten.

6.2.3.2. Ursachen von Fehlbestimmungen und Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie

Die Abgrenzung des heterozyklischen X-Chromosoms von den spät replizierenden Chromosomen ist nicht immer möglich. So wurde das Markierungsmuster der Chromosomen Nr. 4 und Nr. 13 in 10% fälschlicherweise für die X-chromosomale Heterozyklie gehalten. In 3% der Zellen wurde durch 2 eng benachbarte spät replizierende Chromo-

somen ein heterozyklisches X-Chromosom vorgetäuscht. (Tab. 5)

Der hohe Prozentsatz (41%) von Zellen ohne X-chromosomale Heterozyklie ist in unserem Untersuchungsmaterial ausschließlich auf die spät replizierenden Chromosomen zurückzuführen, die gleich oder sogar stärker markiert waren, als das heterozyklische X-Chromosom (Tab. 7).

6.2.3.3. Konstanz spät replizierender Chromosomen

Es fiel auf, daß die spät replizierenden Chromosomen Nr. 4 und Nr. 13 relativ konstant in allen untersuchten Zellen unabhängig vom Vorhandensein des heterozyklischen X-Chromosoms gefunden wurden. Diese Beobachtung unterstützt den Befund einer variablen Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie.

6.2.4. Nebenbefund: Auffallendes Markierungsmuster eines weiteren Chromosoms der C-Gruppe

6.2.4.1. Versuch der Identifizierung

Es fiel uns bei der Auswertung der Mitosen in etwa 50% die Markierung des kurzen Armes und proximalen Langarmabschnittes eines Chromosoms der C-Gruppe auf. (Abb. 5) Nach Entfernung der Silberkörner zeigte sich am langen Arm in der Nähe der Zentromerregion häufig eine Sekundärkonstriktion. Diese Sekundärkonstriktion, die sich bei der Autoradiographie als starke Markierung darstellt, ist für SAKSELA u. MOOREHEAD (1962) charakteristisch für das Chromosom Nr. 9. Vor der Bandenära bezeichneten SASAKI u. MAKINO (1963) und SCHMID (1963) die Chromosomen der C-Gruppe mit Sekundärkonstriktionen im unmarkierten und starken Markierungen im autoradiographierten Zustand als die Chromosomen Nr. 7 und Nr. 11. Inzwischen wurde sowohl von CALDERON u. SCHNEDL (1973) als auch von GANNER u. EVANS (1971) durch Quinacrine Fluoreszenz Banden und Autoradiographie bestätigt, daß die 9qh-Region, die der Sekundärkonstriktion entspricht, stark markiert ist.

Obwohl das von uns beobachtete Markierungsmuster bisher noch nicht beschrieben wurde, vermuten wir aufgrund der Größe und Zentromerregion, daß es sich um ein Chromosom Nr. 9 handelt, bei dem die starke Markierung der Sekundärkonstriktion (9qh) auf den kurzen Arm übergreifen hat (Abb. 6). Der Beweis dafür könnte mit Hilfe der Bandentechniken erbracht werden.

6.2.4.2. Bewertung

Das Auftreten dieses Chromosoms war nicht auf eines der untersuchten Stadien beschränkt und nicht vom Vorhandensein der X-chromosomalen Heterozyklie abhängig (Fig. 7). Seine Häufigkeitsverteilung entsprach bei den 3 Probanden der von Zellen ohne heterozyklisches X-Chromosom. Während die Verteilung von Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie bei den Probanden I und

III nicht differierte, bestätigte sich bei Proband II die abweichende Häufigkeitsverteilung auch gegenüber diesem Chromosom der C-Gruppe (Fig. 9). Somit kann dieses Chromosom als unabhängige Referenz für das Auftreten der X-chromosomalen Replikationsverspätung in der späten S-Phase herangezogen werden.

6.3. Bedeutung der Befunde

6.3.1. Zusammenhang zwischen Zellen ohne X-chromosomaler Heterozyklie und X-Chromatin-negativen Zellen

Die vorliegenden Befunde sprechen dafür, daß das Auftreten heterozyklischer X-Chromosomen in weiblichen Metaphaseplatten ebenso inkonstant ist, wie das Auftreten von X-Chromatinkörperchen in weiblichen Interphasekernen. Dabei wäre es denkbar, daß die X-Chromatin-negativen Zellen in der Interphase mit den Zellen ohne heterozyklisches X-Chromosom in der Metaphase identisch sind (OHNO u. MAKINO 1961; BARR u. CARR 1962). Dies läßt sich jedoch experimentell nicht nachprüfen, da X-Chromatinbestimmungen an vitalen Zellen durchgeführt werden müßten.

Über die X-Chromatinfrequenz in Interphasekernen von Lymphozyten liegen uns keine Werte vor. Im Vergleich zur durchschnittlichen X-Chromatinfrequenz in Haarwurzel- oder Mundschleimhautzellen (Laborstandard 20 - 50%) ist die Frequenz von Zellen mit X-chromosomaler Heterozyklie in den hier untersuchten Lymphozytenmetaphasen (59%) hoch.

Falls die X-Chromatin- und X-Heterozyklie-negativen Zellen identisch wären, könnten die für die X-Chromatin-negativen Zellen bestehenden Vorstellungen über eine funktionsabhängige Variabilität auch für die hier beschriebenen Zellen ohne X-chromosomale Replikationsverspätung zutreffen. Es wird von Schwankungen in der X-Chromatinfrequenz berichtet, die mit unterschiedlichem

Lebensalter, bzw. unterschiedlichen hormonellen Zuständen der untersuchten Individuen gekoppelt sind (Zusammenfassung bei HAGY et al. 1972, zitiert von GUNDLACH 1974): Weibliche Neugeborene haben in den ersten 3 Lebenstagen eine erniedrigte X-Chromatin-Frequenz (SMITH et al. 1962; TAYLOR 1963; FRASIER 1964; HSU 1967; CURTIS 1969), ebenso Frauen über 60 Jahre (SILVESTRI 1957). - Variationen in der Sex-Chromatin-Frequenz während besonderer Abschnitte des menstruellen Zyklus wurden von mehreren Autoren berichtet (BLANCO del CAMPO 1965; DOKUMOV u. SPASOV 1965; RIESEMBERG et al. 1966; 1967; SCHMIDT et al. 1966; LEVI u. CAREL 1968; HAGY et al. 1972), wobei dem Progesteron eine entspiralisierende Wirkung auf das X-Chromosom (niedrige Sex-Chromatin-Frequenz) zugeschrieben wird. Von anderen Autoren wurden diese Befunde nicht bestätigt (BRAINERED et al. 1965; DOLAN 1968). Für diese Befunde spricht jedoch, daß auch schwangere Frauen sehr stark erniedrigte Sex-Chromatinwerte im Vergleich zu normal menstruierenden Frauen haben (TOWNSEND et al. 1970). - Signifikant erniedrigte Sex-Chromatin-Frequenzen wurden ferner bei Hypothyreose (HOEFNAGEL u. WURSTER 1971), Nebennierenrindenüberfunktion (GAREIS et al. 1971), sowie unter Prednisontherapie (SHETTY 1968), nach schweren Verbrennungen (erhöhte Nebennierenrindenaktivität; WESTE et al. 1967), beim Mammacarcinom (KIMEL V. 1957; JAMES 1966; STANLEY et al. 1966; WACKER u. MILES 1966; SHIRLEY 1967) und nach Therapie mit Testosteron bzw. Progesteron (DOKUMOV u. SPASOV 1967) gefunden. - Auch schizophrene Frauen sollen eine reduzierte Sex-Chromatin-Frequenz aufweisen (PLATT 1966). -

Es gibt allerdings keine Vorstellungen über die Art eines eventuellen Zusammenhangs zwischen X-chromosomaler Funktion und X-Chromatinbildung bzw. Heterozyklie. Insbesondere ist nicht bekannt, ob entspiralisierte X-Chromosomen in X-Chromatin-negativen Interphasekernen

an den Synthesevorgängen der Genexpression teilnehmen, oder ob sie auch im entspiralisierten Zustand inaktiv bleiben. Man könnte sich vorstellen, daß entspiralisierte X-Chromosomen in der Interphase, die ebenso genaktiv wie die Autosomen sind, den Befehl zur Reduplikation gleichzeitig mit diesen erhalten und damit nicht das Merkmal der Heterozyklie zeigen. Da jedoch nicht bekannt ist, wovon der Befehl zur späten Replikation des X-Chromosoms abhängt, bleibt diese Vorstellung spekulativ. (Fig. 16)

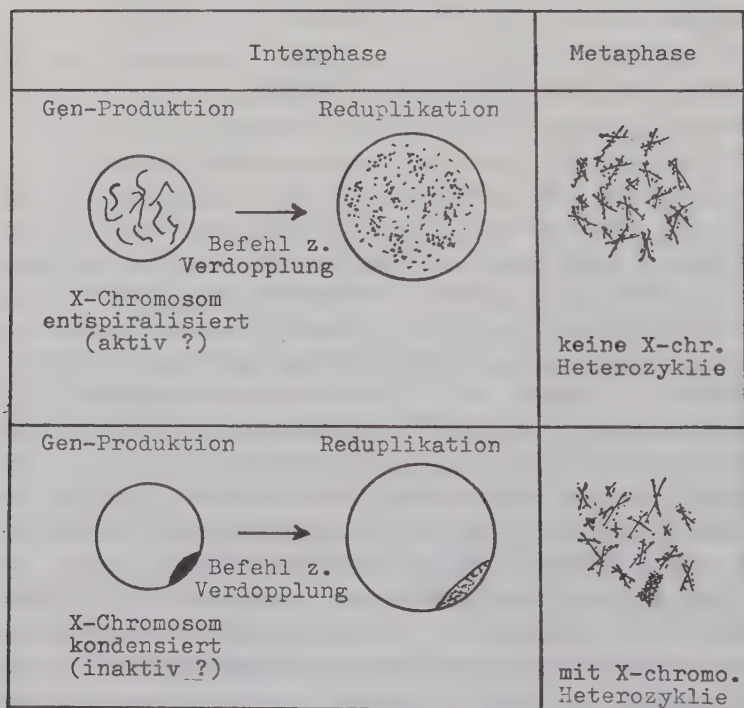


Fig. 16 Versuch einer schematischen Darstellung von möglichen Zuständen des 2. weiblichen X-Chromosoms in der Interphase und in der Metaphase

6.3.2. Zusammenhang mit anderen Befunden über eine variable X-chromosomale Heterozyklieausprägung (GUNDLACH 1974)

Die vorliegenden Befunde über eine fehlende Konstanz der X-chromosomalen Heterozyklie unterstützen auch die Ergebnisse von GUNDLACH, der mit Hilfe eines elektronischen Meßverfahrens in 1165 Zellen von insgesamt 15 Probanden das X-chromosomale Heterozyklie-muster quantitativ untersuchte. Von ihm wurde eine inter-individuelle Variabilität in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie festgestellt, die sich besonders im Spätstadium der DNS-Synthese zeigte.

6.3.3. Bedeutung für weitere Untersuchungen der X-chromosomalen Heterozyklie

Die vorliegende Arbeit zeigt die Notwendigkeit, bei Untersuchungen, welche die X-chromosomale Heterozyklie betreffen, auch die Zellen ohne dieses Merkmal zu erfassen, da diese zur Charakterisierung des Heterozyklieverhaltens beitragen können. Außerdem muß eine Fehlbestimmungsquote des heterozyklischen X-Chromosoms von 13% berücksichtigt werden, wenn keine Kontrolle durch Entfernung der Silberkörner vorgenommen werden kann.

6.3.4. Einschränkung

Einschränkend ist anzumerken, daß sich die vorliegende Untersuchung wegen des hohen präparativen Aufwandes nur auf ein zahlenmäßig geringes Zell- und Probandenmaterial stützen konnte. Die endgültige Bewertung der Ergebnisse sollte daher einer Überprüfung anhand weiteren Untersuchungsmaterials vorbehalten werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen über die Konstanz der X-chromosomalen Heterozyklie an 191 Zellen von 3 Probanden ergaben:

1. Das heterozyklische X-Chromosom war nicht in allen weiblichen Metaphaseplatten vorhanden. Es wurde nur in durchschnittlich 59% der untersuchten Zellen gefunden.
2. Die X-chromosomale Heterozyklie konnte immer dann nicht erkannt werden, wenn andere Chromosomen insbesondere der B-, C- und D-Gruppe gleich spät oder später replizierten.
3. Das heterozyklische X-Chromosom wurde nicht in allen Zellen fehlerfrei bestimmt. Die Kontrolluntersuchungen zeigten Fehlbestimmungen in 13% der Zellen.
4. Zellen ohne heterozyklisches X-Chromosom fanden sich nicht selektiv in den spätesten Stadien der DNS-Replikation, sondern waren annähernd gleich über die vier untersuchten Stadien verteilt, wie Zellen mit heterozyklischem X-Chromosom.
5. Die Verteilung von Zellen mit heterozyklischem X-Chromosom war in den 4 untersuchten Stadien bei den 3 Probanden unterschiedlich. Während die Ergebnisse von 2 Probanden übereinstimmten, fand sich bei der 3. eine abweichende Häufigkeitszunahme von Zellen mit heterozyklischem X-Chromosom in späten Stadien der S-Phase.
6. Ein weiteres Chromosom der C-Gruppe wurde aufgrund seines Markierungsmusters in durchschnittlich 54% der untersuchten Zellen erkannt. Es konnte als Kontrolle für die Beurteilung der X-chromosomalen Heterozyklie herangezogen werden, da die Zellen mit diesem Chromosom die gleiche Häufigkeitsverteilung in den 4 untersuchten Stadien der späten S-Phase aufwiesen, wie die Zellen ohne spät replizierendes X-Chromosom.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) ARAKAKI D.T.; SPARKES R.S.: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. Cytogenetics 2, 57-60, 1963.
- 2) BARR M.L. u. BERTRAM E.G.: A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature 163, 676-677, 1949.
- 3) BARR M.L. u. CARR D.H.: Correlations between sex chromatin and sex chromosomes. Acta cytol. (Philad.) 6, 34-45, 1962.
- 4) BEUTLER E.; YEH M.; FAIRBANKS V.F.: The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity; studies using the gene for G-6-PDH-deficiency as a marker. Proc.Nat.Acad.Sci. 48, 9-16, 1962.
- 5) BIANCHI N.O.; de BIANCHI M.A.: DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures. Chromosoma, Berl. 17, 237-70, 1965.
- 6) BLANCO del CAMPO M.S.; RAMIREZ O.E.: Fluctuations of the sex chromatin during the menstrual cycle. Acta Cytol 9, 251-256, 1965.
- 7) BRAINERD T.; MERCER C.; MILES C.P.: Absence of correlation between sex chromatin incidence and menstrual cycle. Acta Cytol. 9, 440-441, 1965.
- 8) CAIRNS J.: The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. J. molec.-Biol. 6, 208-213, 1963.
- 9) CALDERON D. u. SCHNEDL W.: A comparison between Quinacrine fluorescence banding and ^3H -Thymidine incorporation patterns in human chromosomes. Humangenetik 18, 63-71, 1973.

- 10) CASPERSSON T.; ZECH L.; JOHANSSON C.; MODEST H.J.: Identification of human chromosomes by DNA-banding fluorescent agents. *Chromosoma* 30, 215-17, 1970.
- 11) COHEN M.; RATAZZI M.C.: Cytological and biochemical correlation of late X-chromosome replication and gene inactivation in the mule. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 544-548, 1971.
- 12) COMINGS D.E.: The duration of replication of the inactive X-chromosome in humans based on the persistence of the heterochromatic sex chromatin body during DNA synthesis. *Cytogenetics* 6, 20-37, 1967.
- 13) CURTIS D.J.: Sex chromatin frequency in buccal mucosal tissue: the normal female population. *Cytogenetics* 8, 20-29, 1969.
- 14) DOKUMOV S.J.; SPASOV S.A.: Sex chromatin pattern and menstrual cycle. *Acta Cytol.* 12, 131-136, 1965.
- 15) DOKUMOV S.J.; SPASOV S.A.: Sex chromatin and sex hormones. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 97, 714-718, 1967.
- 16) DOLAN B.E.: Sex chromatin incidence and the human menstrual cycle. *Acta Cytol.* 12, 128-130, 1968.
- 17) EMERY A.E.; KING B.: Pregnancy and serum-creatinine-kinase levels in potential carriers of Duchenne X-linked muscular dystrophy. *Lancet* 1, 1013,
- 18) FITZGERALD P.H.: Autoradiography of terminal DNA replication of the G-group autosomes of man: homologue asynchrony of the late replicating G-pair. *Am. J. Human. Genet.* 23, 390-403, 1971.
- 19) FRASIER S.D.; CRUDO F.S.; FARRELL F.J.: Buccal smears in the newborn female. *J. Pediat.* 65, 222-225, 1964.
- 20) FUDENBURG H.H.; HIRSCHHORN K.: Agammaglobulinaemia: the fundamental defect. *Science* 145, 611-12, 1964.

- 21) GANNER E.; EVANS H.J.: The relationship between patterns of DNA replication and of Quinacrine Fluorescence in the human chromosome complement. *Chromosoma* 35, 326-341, 1971.
- 22) GAREIS F.J.; ASPER A.C.: Low X-chromatin frequency in untreated congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2, 373-374, 1971.
- 23) GAVOSTO F.; PEGORARO L.; ROVERA G.; MASERA P.: Time sequence of DNA replication in heteropycnotic X. *Nature*, Vol. 215, 535-536, 1967.
- 24) GAVOSTO F.; PEGORARO L.; MASERA P.; ROVERA G.: Late DNA replication pattern in human haemopoietic cells. A comparative investigation using a high resolution quantitative autoradiography. *Exp. Cell Res.* 49, 340-58, 1968.
- 25) GERMAN J.L.: III. DNA synthesis in human chromosomes. *Trans. New York Acad. Sci.* 24, 395-407, 1962.
- 26) GERMAN J.L.: The pattern of DNA synthesis in the Chromosomes of human blood cells. *The J. of Cell Biol.* Vol.20, 37-55, 1964.
- 27) GEY W.: Untersuchungen über die DNS-Replikationsmuster der Chromosomengruppen 4-5, 13-15 und 21-22 an in vitro gezüchteten menschlichen Lymphozyten. *Humangenetik* 2, 246-261, 1966.
- 28) GEY W.: Autoradiographie an menschlichen Chromosomen mit ^3H -Thymin. in SCHWARZACHER H.G.; WOLF U., Springer Ver. Berlin, Heidelberg, New York, 1970. S. 67-83.
- 29) GIANELLI F.: The pattern of X-chromosome desoxyribonucleic acid synthesis in two women with abnormal sex-chromosome complement. *Lancet* 1, 863-865, 1963.
- 30) GILBERT C.W.; MULDAL S.; LAJTHA L.G.; ROWLEY J.: Time sequence of human chromosome duplication. *Nature* 195, 869-873, 1962.

- 31) GILBERT C.W.; MULDAL S.; LAJTHA L.G.: Rate of chromosome duplication at the end of the desoxyribonucleic acid synthetic period in human blood cells. *Nature* 208, 159-161, 1965.
- 32) GRUMBACH M.M.; MORISHIMA A.; TAYLOR J.H.: Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 49, 581-589, 1963.
- 33) GUNDLACH H.: Quantitative autoradiographische Studie über das heterozyklische X-Chromosom der Frau. *Med. Dissertation, Marburg* 1974.
- 34) HAGY G.W.; BRODERICK M.M.: Variations of sex-chromatin in human oral mucosa during the menstrual cycle. *Acta Cytol.* 16, 314-322, 1972.
- 35) HAMERTON J.L.; GIANELLI F.; COLLINS F.; HALLETT J.; FRYER A.; Mc GUIRE V.M.; SHORT R.V.: Non random X-inactivation in the female mule. *Nature* 222, 1277-1278, 1969.
- 36) HEIL B.: Spätreplicierendes X-Chromosom und Sexchromatinhäufigkeit beim Menschen. *Humangenetik* 9, 64-74, 1969.
- 37) HOEFNAGEL D.; WURSTER D.: Low X-chromatin frequency in a case of hypothyroidism. *Lancet* 2, 978, 1971.
- 38) HSU L.Y.F.; KLINGER H.P.; WEISS J.: Influence of nuclear selection criteria on sex chromatin frequency in oral mucosal cells of newborn females. *Cytogenetics* 6, 371-382, 1967.
- 39) JAMES J.: Sex chromatin in breast carcinoma. *Lancet* 1, 924, 1966.
- 40) JOHN B.; LEWIS K.R.: B. The chromosome cycle: Protoplastologie VI Kern- und Zellteilung. Springer Verlag Wien, New York 1969.
- 41) KIKUCHI Y.; SANDBERG A.A.: Chronology and pattern of human chromosome replication. I. Blood leucocytes of normal subjects. *J. Nat. Canc. Inst.* 32, 1109-1143, 1964.

- 42) KIMEL V.: Clinical-cytological correlations of mammary carcinoma based upon sex chromatin counts. A preliminary study. *Cancer* 10, 922-927, 1957.
- 43) LEVIJ I.S.; CAREL R.: Variations in the incidence of sex chromatin - a reappraisal. *Acta Cytol.* 12, 352-356, 1968.
- 44) LIMA de FARIA A.; REITALU J.; BERMAN S.: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man. *Hereditas* 47, 695-704, 1961.
- 45) LYON M.F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372-373, 1961.
- 46) LYON M.F.: Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 14, 135-148, 1962.
- 47) LYON M.F.: Attempts to test the inactive -X theory of dosage compensation in mammals. *Genetic Res.* 4, 93-103, 1963.
- 48) LYON M.F.: Sex-chromatin and gene action in the X-chromosome of mammals. in: *The sex chromatin.* ed. MOORE K.L. W.B. SAUNDERS Comp. Philadelphia, London, 1966. S. 370-387.
- 49) MOOREHEAD P.S.; DEFENDI V.: Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 16, 202-209, 1963.
- 50) MORISHIMA A.; GRUMBACH M.M.; TAYLOR J.H.: Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 48, 756-763, 1962.
- 51) MUKHERJEE B.B.; SINHA A.K.: Single-active-X hypothesis: cytological evidence for random inactivation of X-chromosomes in a female mule complement. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 51, 252-259, 1964.
- 52) MULLER H.J.: Evidence of the precision of genetic adaptation. *Harvey lectures* 43, 165, 1947.

- 53) OCKEY C.H.: Human chromosome identification and the pattern of DNA replication in fibroblasts from an XXY male. A quantitative autoradiographic study of early and late synthesis. *Cytogenetics* 8, 272-295, 1969.
- 54) OHNO S.; KAPLAN W.D.; KINOSITA R.: X-chromosome behaviour in germ and somatic cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* 22, 535-544, 1961.
- 55) PASSARGE E.: Der Karyotyp des Menschen. Identifizierung von Mitosechromosomen und Auswertung cytogenetischer Befunde in: SCHWARZACHER H.G.; WOLF U. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1970, S. 86.
- 56) PEARSON C.M.; FOWLER W.H.; WRIGHT S.W.: X-chromosome mosaicism in females with muscular dystrophy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 24-31, 1963.
- 57) PELC S.R.: Autoradiograph technique. *Nature* 160, 749-750, 1947.
- 58) PLATT L.J.; KALLIN E.W.: Sex chromatin frequency. *J. Amer. Med. Ass.* 187, 182-186, 1964.
- 59) RIESENBERG D.E.; van PEENEN H.J.; SCHMIDT M.; MILLER W.V.; LUCAS F.V.: Evidence for activation of the second X-chromosome in females. *Fed. Proc.* 25, 234, 1966.
- 60) RIESENBERG D.E.; van PEENEN H.J.; MILLER W.V.; SCHMIDT M.; LUCAS F.V.: Further evidence for cyclic activation of the heterochromatic X-chromosome in human females. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 97, 91-93, 1967.
- 61) SAKSELA E.; MOORHEAD P.S.: Enhancement of secondary constrictions and the heterochromatic X in human cells. *Cytogenetics* 1, 225-244, 1962.
- 62) SASAKI M.S.; MAKINO S.: The demonstration of secondary constrictions in the human chromosomes by means of a new technique. *Amer. J. Hum. Genet.* 15, 24-33, 1963.

- 63) SCHMID W.: DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics* 2, 175-193, 1963.
- 64) SCHMIDT M.E.; MILLER W.V.; van PEENEN H.J.; LUCAS F.V.: Changes in sex chromatin pattern during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynec.* 94, 422-424, 1966.
- 65) SCHWARZACHER H.G.: Untersuchung des Sexchromatins. in SCHWARZACHER H.G.; WOLF U. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1970, S. 150.
- 66) SHETTY K.T.; SHARMA N.L.; WAHAL K.M.: Sex chromatin in prednisone-treated children. *Brit. med. J.* II, 84-86, 1966.
- 67) SHIRLEY R.: The nuclear sex of breast cancer. *Surg. Gynec. Obstet.* 125, 737-40, 1967.
- 68) SILVESTRI C.: Osservazioni sulle cellule a "chromatini positiva" e a "chromatina negativa" in cute umana dell'eta senile. *Arch. Ital. Derm. Vener.* 28, 341-347, 1957.
- 69) SMITH D.W.; MARDEN P.M.; Mc DONALD M.J.; SPECKHARD M.: Lower incidence of sex chromatin in buccal smears of newborn females. *Pediatrics* 30, 707-711, 1962.
- 70) SÖREN L.: Demonstration of a very short post-mitotic G₁ period in proliferating PHA-stimulated lymphocytes. *Exptl. Cell Res.* 78, 231, 1973.
- 71) STANLEY M.A.; BIGHAM D.A.; COX R.J.; KIRKLAND J.A.; OPIT L.J.: Sex chromatin anomalies in female patients with breast carcinoma. *Lancet* 1, 690-691, 1966.
- 72) SUMNER A.T.; EVANS H.J.; BUCKLAND R.A.: New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.* 232, 31, 1971.
- 73) TAYLOR J.H.; WOODS P.S.; HUGHES W.L.: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 43, 122-128, 1957.

- 74) TAYLOR J.H.: Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. J. biophys. biochem. Cytol. 7, 455-463, 1960.
- 75) TAYLOR A.J.: Sex-chromatin in the newborn. Lancet 1, 912-914, 1963.
- 76) TOWNSEND J.F.; CASE M.S.; LUCAS F.: The sex chromatin count in pregnancy. Amer. J. Gynec. 108, 499-515, 1970.
- 77) WACKER B.; MILES C.P.: Sex chromatin incidence and prognosis in breast cancer. Cancer 19, 1651-1654, 1966.
- 78) WESTE S.M.; BARNETT J.S.; GARSON O.M.; BAIKIE A.G.: Variations in the frequency and form of sex chromatin in females with burns. Lancet 1, 745-746, 1967.

Dem Leiter des genetischen Labors der Kinderpoliklinik, Herrn Professor Jan-Diether Murken, danke ich für die Überlassung des Themas, die Diskussion der Ergebnisse und die Korrektur der Arbeit.

Dem Direktor der Kinderpoliklinik, Herrn Professor Heinz Spiess, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. med. Sabine Stengel-Rutkowski danke ich besonders für die Einführung in die Problematik, die Unterstützung bei der Durchführung und den wertvollen Rat bei der Diskussion der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 14. November 1947 wurde ich als drittes Kind des Vermessungsdirektors a.D. Herbert Daten und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Keiger, in Göttingen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule und des neusprachlichen Gymnasiums legte ich am 16. Juni 1967 in Göttingen das Abitur ab.

Vom 3. Juli 1967 bis 30. Juni 1969 diente ich in Hamburg, Oldenburg und München bei der Bundeswehr, zunächst als Wehrpflichtiger, dann als Zeitsoldat.

Zum Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich an der Universität Göttingen in den Fächern Biologie und Physik. Zum Sommersemester 1970 erhielt ich einen Studienplatz an der medizinischen Fakultät der Universität München. Am 16.3.71 bestand ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 18.10.72 die ärztliche Vorprüfung. Am 23.6.76 beendete ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen.

Am 1.10.76 begann ich meine Medizinalassistentenzeit in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Altötting.

Seit dem 17.2.75 bin ich mit der Studienrätin i. Pr. Regina Daten, geb. Dietrich, verheiratet.

München, den 26.10.1976

